

University of Groningen

Virulente en minder virulente tuberkelbacteriën

Steenhuis, Evert Jan

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

1965

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Steenhuis, E. J. (1965). *Virulente en minder virulente tuberkelbacteriën*. [, Rijksuniversiteit Groningen]. [S.n.].

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

VIRULENTE EN MINDER VIRULENTE TUBERKELBACTERIËN

EEN EXPERIMENTEEL ONDERZOEK BIJ CAVIAE

EVERT JAN STEENHUIS

**VIRULENTE EN MINDER
VIRULENTE TUBERKELBACTERIËN**

EEN EXPERIMENTEEL ONDERZOEK BIJ CAVIAE

STELLINGEN

1

De tuberculeuze afwijkingen, die na infectie met een homogene, hoog INH-resistente tuberkelbacteriëncultuur in cavia-organen ontstaan, vertonen geen histologische kenmerken, waardoor ze zich onderscheiden van de afwijkingen die door INH-sensibele bacteriën worden veroorzaakt.

2

Een positief geworden tuberculinereactie bij experimentele cavia-tuberculose kan door INH-toediening weer negatief worden.

3

In weefselcoupes laten tuberkelbacteriën zich met de Ziehl-Neelsen kleuring moeilijk aantonen.

4

Het is aan te bevelen met atypische tuberculines te testen, wanneer het ziektebeeld verdacht is voor een actief tuberculeus proces en de gewone tuberculine huidreacties zwak positief of negatief zijn.

5

Behandeling met kalium, glucose en insuline verbetert de prognose van het myocardinfarct.

(THE LANCET, 1965 II, 7413 — 607)

6

Een compressio vertebrae bij een bestaande osteoporose o.a. door langdurig gebruik van prednisolon is in zijn beginstadium alleen met planigrafisch onderzoek met zekerheid te herkennen.

7

Voor de revascularisatie van het ischaemisch myocard heeft de operatie volgens VINEBERG niet die aandacht gekregen, die ze verdient.



8

Frequent cytologisch onderzoek bij enkelzijdige sinusitis maxillaris op oudere leeftijd draagt in sterke mate bij tot het vroegtijdig herkennen van bovenkaakscarcinoom.

9

Er zijn aanwijzingen dat, evenals dit bij het bronchuscarcinoom het geval is, de oorzaak van het ontstaan van het nasopharynxcarcinoom gezocht moet worden in een combinatie van exogene en endogene momenten.

(THE LANCET, 1965 II, 7417 — 833)

10

Bij toediening van tetracycline aan jonge kinderen moet niet alleen rekening worden gehouden met de mogelijkheid van beschadiging van het melkgebit, doch ook van het blijvend gebit.

(NED. TIJDSCHR. GENEESK., 1965, 41 — 1909)

11

Op poliklinieken kan getracht worden door het invoeren van afspraakspreekuren de wachttijd van patiënten te bekorten, hetgeen de patiënt en het bedrijfsleven ten goede komt.

STELLINGEN BEHORENDE BIJ
E. J. STEENHUIS
VIRULENTE EN MINDER VIRULENTE TUBERKELBACTERIËN
EEN EXPERIMENTEEL ONDERZOEK BIJ CAVIAE
GRONINGEN
1965

RIJSUNIVERSITEIT TE GRONINGEN

VIRULENTE EN MINDER VIRULENTE TUBERKELBACTERIËN

EEN EXPERIMENTEEL ONDERZOEK BIJ CAVIAE
(WITH A SUMMARY IN ENGLISH)

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR
IN DE GENEESKUNDE

AAN DE RIJSUNIVERSITEIT TE GRONINGEN
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS MR. E. H. S' JACOB,
HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER RECHTSGELEERDHEID,
IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN OP WOENSDAG 15 DECEMBER 1965
DES NAMIDDAGS TE 3 UUR PRECIES

DOOR

EVERT JAN STEENHUIS

GEBOREN TE MUNTENDAM

1965

DRUKKERIJ TORENLAAN

ASSEN

PROMOTOR: PROF. DR. J. K. KRAAN

Aan mijn ouders
Aan Klazien
Aan Marianne en Luc

Met erkentelijkheid wordt hier melding gemaakt van de financiële steun, die voor de bewerking van dit proefschrift werd ontvangen van de Gezondheidsorganisatie T.N.O., de Koninklijke Nederlandse Centrale Vereniging tot bestrijding der Tuberculose en het bestuur van „Beatrixoord”.

VOORWOORD

De voltooiing van dit proefschrift geeft me de gelegenheid mijn Vader en Moeder te danken voor de mogelijkheid, die ze mij hebben gegeven universitair onderwijs te kunnen volgen. Dat dit voor U niet altijd even gemakkelijk is geweest, ben ik mij volkomen bewust, ik wil U nogmaals recht hartelijk dank zeggen.

Hoogleraren, Oud-Hoogleraren, Lectoren en Docenten van de Medische Faculteit der Rijksuniversiteit te Groningen, U ben ik erkentelijk voor het genoten onderwijs.

Hooggeleerde KRAAN, Hooggeachte Promotor, ik beschouw het als een voorrecht, dat ik mij onder Uw leiding in de leer en praktijk van de longziekten heb kunnen specialiseren. De belangstelling, die U steeds aan de dag legt voor de problemen van de patiënt, zowel op medisch als op maatschappelijk terrein, is voor mij het voorbeeld geweest om de patiënt niet alleen medisch-technisch, doch ook in zijn verhouding tot de medemens en maatschappij te blijven zien.

Het resultaat van Uw „stimulantia” om dit proefschrift te voltooien ligt voor U. Ik ben oprecht dankbaar voor Uw aanmoedigen.

Hooggeleerde ORIE, de tijd die ik in de longafdeling heb doorgebracht was voor mij zeer vruchtbaar. In Uw kliniek heb ik de mogelijkheid gehad om ook niet-tuberculeuze longziekten en wel speciaal C.A.R.A.-patiënten te leren behandelen. Ik ben U daar zeer erkentelijk voor.

Hooggeleerde MANDEMA, ik dank U dat ik in Uw kliniek heb mogen werken om als longarts inzicht te krijgen in de Interne Geneeskunde.

Hooggeleerde ARENDS, Hooggeleerde HADDERS, een groot deel van het onderzoek werd in Uw laboratorium verricht. Zonder Uw gewaardeerde hulp was dit onderzoek niet mogelijk geweest. Een woord van bijzondere dank ben ik U hiervoor verschuldigd. Dank wil ik ook uitbrengen aan Uw medewerkers, die het histologisch onderzoek hebben verricht.

Zeergeleerde mevrouw MULDER—DE JONG, beste Marty, jouw kritisch oordeel bij het doornemen van het manuscript en jouw waardevolle adviezen waren van onschatbare waarde. Ik wil je hiervoor hartelijk bedanken.

De hulp, die ik bij de statistische berekeningen van Ir. J. T. N. VENEKAMP kreeg waren voor mij van niet te onderschatten waarde.

Jan, met grote bewondering heb ik gezien hoe jij met getallen omgaat. Mijn dank voor je medewerking.

De collegae van „Beatrixoord” dank ik voor de prettige samenwerking.

De dames en heren van het laboratorium en van de proefdierenstal wil ik bedanken voor het vele werk, dat ze voor dit onderzoek hebben gedaan. Ik hoop, dat niemand zich tekort gedaan voelt, als hier alleen de namen van de heren TAP, BOOTSMA en NOORD worden vermeld. In dezen wil ik alle medewerkers dank zeggen.

Geachte heren BLOM en HUITENGA, ik ben U erkentelijk voor de wijze, waarop U mijn samenvatting heeft vertaald.

Geachte mejuffrouw MARTENS, voor het vele typewerk, dat U heeft verricht, ben ik U bijzonder dankbaar.

Dames en heren bestuursleden van „Beatrixoord”, U wil ik mijn dank betuigen, dat U mij het mogelijk heeft gemaakt dit onderzoek in „Beatrixoord” te kunnen doen.

INHOUD

INLEIDING	1
HOOFDSTUK I. EIGENSCHAPPEN VAN INH-RESISTENTE TUBERKEL- BACTERIËN	3
INH-RESISTENTIE	3
Par. 1. GROEIEIGENSCHAPPEN	4
Par. 2. FERMENTEN	5
a. Katalase	5
b. Correlatie tussen INH-gevoeligheid en katalase-activiteit . .	6
c. Peroxidase	7
d. Urease	7
Par. 3. VIRULENTIE VOOR CAVIAE	8
a. De virulentie van INH-resistente tuberkelbacteriën	8
1. Overlevingstijd	9
2. Gewichtsverloop	9
3. Tuberculinereactie	9
4. Macroscopische tuberculeuze afwijkingen	10
5. Histologische tuberculeuze afwijkingen	12
6. Orgaancultuur	12
b. De virulentie van mengpopulaties	13
c. Invloed van de resistentiegraad op de virulentie	14
d. Correlatie tussen INH-resistentie, katalase-activiteit en vermin- derde virulentie	15
e. Invloed van de infectiewijze en de infectiedosis op de viru- lentie van INH-resistente tuberkelbacteriën	15
f. De invloed van voor tuberculose ongunstige factoren op de virulentie van INH-resistente tuberkelbacteriën	16
Par. 4. VIRULENTIE VAN INH-RESISTENTE TUBERKELBACTERIËN VOOR ANDERE PROEFDIEREN	17
Par. 5. HET HISTOLOGISCH BEELD VAN DE TUBERCULEUZE AFWIJKINGEN VEROORZAAKT DOOR INH-RESISTENTE TUBERKELBACTERIËN . . .	18
Par. 6. INH-RESISTENTE TUBERKELBACTERIËN BIJ DE MENS	19
a. Primaire tuberculose na besmetting met INH-resistente tuber- kelbacteriën	19
b. Het verloop van longtuberculose, nadat de bacteriën resistent zijn geworden	21
HOOFDSTUK II. INVLOED VAN INH OP DE TUBERCULEUZE INFECTIE IN HET DIEREXPERIMENT	25
Par. 1. DE WERKING VAN INH IN VITRO	25
Par. 2. FACTOREN DIE HET THERAPEUTISCH EFFECT VAN INH BIJ TUBER- CULOSE DOOR INH-SENSIBELE TUBERKELBACTERIËN BEÏNVLOEDEN	26
a. Infectiedosis	26
b. Virulentie van de tuberkelbacteriën	26

c. Optreden van resistentie	27
d. Begin INH-therapie	27
e. Dosis INH	27
f. Duur van de therapie	28
g. Observatieduur	28
h. Keuze van het proefdier	28
i. INH-inactivatoren	29
Par. 3. TUBERCULINEREACTIE ONDER INVLOED VAN INH-BEHANDELING . .	29
Par. 4. INVLOED VAN INH OP EEN INFECTIE MET INH-RESISTENTE TUBER- KELBACTERIËN	30
HOOFDSTUK III. EIGEN ONDERZOEK EN VERGELIJKING MET RESUL- TATEN UIT DE LITERATUUR	
Proef A. Infectie van caviae met een INH-sensibele laboratorium- cultuur van tuberkelbacteriën (H37Rv)	31
Proef B. Infectie van caviae met dezelfde laboratoriumcultuur en behandeling met INH	33
Proef I. Infectie van caviae met een INH-sensibele tuberkelbacte- riëncultuur afkomstig uit het sputum van een patiënt . .	34
Proef II. Infectie van caviae met dezelfde INH-sensibele cultuur en behandeling met INH	37
Proef III. Infectie van caviae met een INH-resistente tuberkelbacte- riëncultuur afkomstig uit het sputum van een patiënt . .	40
Proef IV. Infectie van caviae met dezelfde INH-resistente cultuur en behandeling met INH	43
Proef 1. Infectie van caviae met een INH-sensibele tuberkelbacte- riëncultuur afkomstig uit het sputum van een patiënt . .	50
Proef 2. Infectie van caviae met een INH-resistente tuberkelbacte- riëncultuur afkomstig uit het sputum van een patiënt . .	54
Proef 3. Infectie van caviae met dezelfde INH-resistente cultuur en behandeling met INH	56
SAMENVATTING EN CONCLUSIES	58
SUMMARY	68
LITERATUUR	78
	85

INLEIDING

Het is de bedoeling van dit onderzoek het verloop van een tuberculeuze infectie bij caviae na te gaan, wanneer deze dieren worden besmet met verschillende culturen tuberkelbacteriën. Tevens wordt de invloed van het medicijn isonicotinezuurhydrazide, in het vervolg aangeduid als INH, bij deze infecties onderzocht. Omdat in de literatuur over een aantal vraagstukken geen eenstemmigheid bestaat, meenden we verschillende onderzoeken te moeten herhalen. Dit werd mogelijk doordat de Gezondheidsorganisatie T.N.O. financiële steun verleende.

Een infectie door een laboratoriumstam (stam H37Rv) van tuberkelbacteriën, die gevoelig zijn voor INH, wordt vergeleken met een infectie veroorzaakt door een INH-gevoelige tuberkelbacteriëncultuur afkomstig uit het sputum van een onbehandelde patiënt. Aan de hand van gewichtsverloop en overlevingstijd van de cavia, macroscopie en histologie van lever, milt, long en nier en de kweekbaarheid van tuberkelbacteriën uit deze organen zal de infectie bij het proefdier worden geanalyseerd. De vraag, die gesteld wordt is of er verschillen bestaan tussen beide soorten van infecties, m.a.w. of er verschil in virulentie is tussen beide gebruikte INH-sensibele culturen. Verder wordt nagegaan of INH dezelfde invloed op het verloop van de tuberculose heeft en of het histologisch beeld van de tuberculeuze afwijkingen in de interne organen identiek is.

Op analoge wijze wordt onderzocht of er verschil bestaat tussen een tuberculeuze infectie door INH-sensibele en INH-resistente tuberkelbacteriën. Bij dit onderzoek zijn beide culturen afkomstig uit het sputum van een patiënt. Door overentingen op INH bevattende voedingsbodems is getracht de resistente sputumcultuur zo goed mogelijk homogeen resistent te verkrijgen. Immers uit de literatuur blijkt, dat INH-resistente tuberkelbacteriën een bijzondere plaats innemen en wel speciaal is aandacht gevestigd op de verminderde virulentie van deze tuberkelbacteriën voor de cavia.

In hoofdstuk I en hoofdstuk II wordt ingegaan op de literatuur,

welke betrekking heeft op dergelijke onderzoeken en hier en daar vergeleken met eigen ervaringen.

In hoofdstuk III wordt het eigen onderzoek beschreven en getoetst aan de bevindingen uit de literatuur.

Hoofdstuk I

EIGENSCHAPPEN VAN INH-RESISTENTE TUBERKELBACTERIËN

INH-RESISTENTIE

Wanneer mag men spreken van resistentie van de bacteriën voor INH? Hierover bestaan in de literatuur nogal uiteenlopende meningen.

RIST (1955) spreekt van INH-resistentie, wanneer groei optreedt op een voedingsbodem, waaraan 0,1 mcg INH/ml is toegevoegd, terwijl Das Deutsches Komitee zur Bekämpfung der Tuberkulose (zie MEISSNER, 1956) een tuberkelbacteriëncultuur resistent noemt, wanneer groei plaats vindt bij aanwezigheid van 10 mcg INH/ml. Andere auteurs geven tussenliggende concentraties op. MEISSNER (1956) en MITCHISON (1954) betitelen een cultuur INH-resistent, wanneer deze cultuur groeit bij een concentratie van 1 mcg INH/ml voedingsbodem. PETIT (1953) neemt een concentratie van 5 mcg INH/ml. STEENKEN (1953) deelt de resistentiegraden als volgt in. Licht resistent, wanneer groei optreedt op de buis met 0,2 mcg INH/ml, matig resistent bij groei op de buis met 1 mcg INH/ml en hoog resistent, wanneer de tuberkelbacteriën groeien bij een concentratie van 10 mcg INH/ml.

Bij de resistentiebepalingen speelt de onderzoeksmethode een belangrijke rol en zijn de gebruikte voedingsbodem, dosis geënte bacteriën en de afleestijd van invloed. In „Beatrixoord” werd aanvankelijk geënt met een entdosis van 1 mg (= in aantal ongeveer 5×10^7) bacteriën per buis en werd van INH-resistentie gesproken, wanneer de tuberkelbacteriën bij aanwezigheid van 0,1 mcg INH/ml ongeveer gelijk groeiden als op de controlebuis of wanneer op de buis met 0,3 mcg INH/ml een groot aantal kolonies verschenen. We gebruiken de vaste eibodem volgens BEEUWKES (1950), terwijl de aflezing drie weken na enting gebeurt (MULDER, 1960).

Bij een dergelijke enting van 1 mg is er echter al vaak een flinke groei op de buis met 0,1 mcg INH/ml. Wanneer met deze zware dosis wordt geënt is het aantal voor INH primair ongevoelige mutanten, die in iedere stam tuberkelbacteriën aanwezig zijn, voldoende om in de resistentieproef tot groei te komen op de buizen, waaraan een lage concentratie INH is toegevoegd. CANETTI, RIST en GROSSET (1964) geven hierover enkele waarden. Een willekeurige cultuur bevat per 10^6

tuberkelbacteriën ongeveer 10 mutanten, die kunnen groeien op een Löwensteinbodem met 0,2 mcg INH/ml. Wordt met een zware enting (bijv. 5×10^6 bacteriën) de resistentie van deze cultuur bepaald, dan zien ze duidelijke groei van de mutanten op de resistentiebuis met 0,2 mcg INH. Dit kunnen wel 100 kolonies zijn. Bacteriën, die op een dergelijke manier groeien worden door de U.S. PUBLIC HEALTH SERVICE (1964) als INH-resistent gekwalificeerd. Deze willekeurige sensibele cultuur wordt dus verkeerd als resistent geïnterpreteerd. De zware enting op de resistentiebuis is tijdens ons onderzoek nog toegepast. Thans wordt in „Beatrixoord” geënt met 0,001 mg (= in aantal ongeveer 5×10^4) bacteriën per buis. Een tuberkelbacteriënpopulatie wordt door ons INH-gevoelig genoemd, wanneer op de controlebuis meer dan 100 kolonies (groei ++) groeien, terwijl op de buis met 0,05 mcg INH/ml slechts enkele kolonies mogen voorkomen. Op de buis met 0,1 mcg INH/ml is geen groei. Van een beginnende INH-resistentie wordt gesproken als op de controlebuis meer dan 100 kolonies groeien en op de buis met 0,05 mcg INH/ml meer dan 20 kolonies aanwezig zijn. Ook deze resistentiebepaling wordt verricht op voedingsbodems volgens BEEUWKES en wordt het resultaat na 3 weken afgelezen. De bij ons onderzoek gebruikte INH-resistente tuberkelbacteriën vertoonden een even sterke groei bij een concentratie van 30 mcg INH/ml als bij 0 mcg INH, zodat we deze cultuur zeker als resistent mogen kwalificeren.

Bij de bespreking van de eigenschappen van INH-resistente tuberkelbacteriën moet voorop gesteld worden, dat wordt uitgegaan van homogeen resistente culturen en niet van mengpopulaties, waarbij de daarin aanwezige INH-sensibele tuberkelbacteriën het beeld kunnen vertroebelen. Op bladzijde 13 wordt verder op het begrip mengpopulaties ingegaan.

PAR. 1

GROEI-EIGENSCHAPPEN

INH-resistente bacteriën groeien in culturen langzamer dan INH-sensibele tuberkelbacteriën. Bovendien is de groei meer dysgoon en lijkt daardoor op die van het bovine type, dat ook met fijne, weinig verheven, gelijkmatige kolonies groeit (MEISSNER, 1956).

Op een eigeelvoedingsbodem volgens GOTTSACKER blijkt toevoeging van glycerine een ongunstige invloed op de groei van INH-resistente

bacteriën te hebben, dit in tegenstelling met INH-sensibele tuberkelbacteriën (KREBS, 1956).

Mangaanionen hebben in een bepaalde voedingsbodem wel een remmende werking op de groei van INH-resistente bacteriën, doch INH-sensibele tuberkelbacteriën hebben een veel grotere concentratie mangaanionen nodig om in hun groei te worden geremd (COHN, 1954).

Daarnaast bestaan stoffen, die een groeibevorderende werking op INH-resistente tuberkelbacteriën hebben, zo noemt FISHER (1952, 1954) haemine, serumalbumine en haemoglobine. COHN (1954) wijst op de groeibevorderende werking van anorganisch ijzer, alphaketo-zuren en katalase. STONEBRINK (1958) ziet in het toevoegen van pyrodruivenzuur aan de voedingsbodem een groeibevorderende factor voor INH-resistente tuberkelbacteriën. Hij wijst er echter op, dat deze pyrodruivenzuur bevattende voedingsbodem niet gebruikt kan worden voor resistentiebepalingen, daar het toegevoegde INH gedeeltelijk door pyrodruivenzuur onwerkzaam wordt gemaakt.

PAR. 2

FERMENTEN

a. KATALASE

Een van de gemakkelijkst te bepalen verschillen tussen INH-gevoelige en INH-resistente tuberkelbacteriën is wel de verminderde katalase-activiteit van laatstgenoemde bacteriën. De bepaling van de katalase-activiteit is eenvoudig en daardoor een vooraanstaand differentiaal diagnosticum tussen INH-gevoelige en INH-resistente tuberkelbacteriën geworden.

MIDDLEBROOK (1954) wijst erop, dat tuberkelbacteriën een enzym, katalase, produceren, dat waterstofperoxyde kan splitsen in water en zuurstof. De vrijgekomen zuurstof kan kwantitatief worden gemeten met behulp van het WARBURG-apparaat, doch ook kwalitatief is de zuurstofontwikkeling waar te nemen, bijvoorbeeld met de objectglas-methode.

De katalase-activiteit van een tuberkelbacteriëncultuur wordt door ons als volgt bepaald. In het centrum van een objectglaasje is een klein rond kuiltje uit het glas geslepen. Hierin worden enkele druppels mengsel van gelijke delen waterstofperoxyde 30% en 10% T-Pol (een synthetisch wasmiddel, dat verlaging van de oppervlaktespanning geeft) gebracht. Een oese van de te onderzoeken cultuur wordt bij dit mengsel

gevoegd. Spoedig ontwikkelen zich zuurstofbelletjes, die met een loupe duidelijk zichtbaar zijn. De sterkte van de zuurstofontwikkeling en het moment, waarop de eerste zuurstofbelletjes zich vertonen, vormen een maat voor de katalase-activiteit van de cultuur. Er is verband tussen de sterkte van de gasvorming, het eerste moment van gasontwikkeling en de bacteriesoort. Dit verband is weergegeven in tabel 1.

Eerste moment van zuurstofontwikkeling	Sterkte van zuurstofontwikkeling	Bacteriesoort
0- 2 sec.	zeer sterk	de meeste atypische mycobacteriën saprophyten
3-10 sec.	normaal	INH-gevoelige tuberkelbacteriën
10-30 sec. > 30 sec.	verminderd spoor	INH-resistente tuberkelbacteriën

Tabel 1

Versand tussen zuurstofontwikkeling en bacteriesoort zoals blijkt uit de katalaseproef.

Uit tabel 1 blijkt, dat bij INH-sensibele tuberkelbacteriën de zuurstofontwikkeling na 3-10 seconden optreedt, we spreken dan van een normale, positieve katalase. De meeste atypische mycobacteriën en saprophyten hebben een snelle, positieve katalase. INH-resistente tuberkelbacteriën hebben een langzame, negatieve katalase-activiteit.

b. CORRELATIE TUSSEN INH-GEVOELIGHEID EN KATALASE-ACTIVITEIT

Er blijkt dus een correlatie te bestaan tussen de INH-gevoeligheid en de katalase-activiteit. MIDDLEBROOK (1954) vindt, dat alle voor 10 mcg/ml INH-resistente tuberkelbacteriën een verminderde katalase-activiteit bezitten, terwijl de voor 1 mcg/ml INH-resistente culturen slechts ten dele een verminderde katalase-activiteit vertonen. Alle door hem onderzochte INH-gevoelige culturen hadden een normale katalase-activiteit.

MEISSNER en BÖNICKE (1957) kwamen tot dezelfde conclusies. Zij vonden een bijna volledige overeenstemming tussen de resistentie van

de culturen en hun katalase-activiteit. Hoe hoger de graad van INH-resistentie, des te geringer de katalasewerking, slechts bij een lage graad van INH-resistentie kan de katalase-activiteit zijn behouden. Volgens hen kan de aanwezigheid van sensibele kiemen in een populatie bij de bepaling van de katalase storend werken. De verminderde katalase-activiteit blijft bestaan zolang de populatie resistent blijft voor INH. Het weer katalase-positief worden van een cultuur is een gevolg van het toenemen van de daarin aanwezige sensibele tuberkelbacteriën.

WOLINSKY (1956) wijst erop, dat het vinden van een verminderde katalase-activiteit gekoppeld is aan een matige tot sterke graad van resistentie voor INH. BÖNICKE (1957), BERNARD (1955), KNOX (1956), COHN (1954) en KREBS (1956) vermelden eveneens de verminderde katalasewerking van INH-resistente tuberkelbacteriën.

c. PEROXIDASE

TIRUNARAYANAN en VISCHER (1957) vonden, dat INH-resistente tuberkelbacteriën door hun peroxidase-activiteit te onderscheiden zijn van INH-sensibele. Om peroxidase-activiteit aan te tonen nemen zij catechol (orthodiphenol) als „acceptor”. Catechol wordt bij aanwezigheid van waterstofperoxyde door het in de tuberkelbacterie voorkomende enzym peroxidase geoxydeerd tot o-benzoquinone, waarbij een bruine verkleuring van de catechol ontstaat. De vorming van de bruine kleur wordt als maat beschouwd voor de peroxidase-activiteit. INH-sensibele tuberkelbacteriën hebben een positieve peroxidase-activiteit, d.w.z. binnen 10 minuten treedt een bruine verkleuring van catechol op. INH-resistente tuberkelbacteriën, zelfs van de buis met 0,1 mcg INH/ml, hebben een negatieve peroxidase-activiteit, de bruine verkleuring van catechol treedt niet op.

INH-sensibele tuberkelbacteriën hebben, zoals uit voorgaande blijkt, een positieve katalase en peroxidase-reactie, terwijl beide reacties bij INH-resistente bacteriën negatief zijn. Saprophyten als *m.phlei* en *m.smegmatis* hebben echter een positieve katalase-reactie, doch een negatieve peroxidase-activiteit.

d. UREASE

Humane INH-gevoelige tuberkelbacteriën bezitten het ferment urease om ureum te hydroliseren, waardoor ammoniak ontstaat. Deze hydro-

lyse van ureum is na 24 uur met behulp van kleurreacties aan te tonen. Bovine tuberkelbacteriën en INH-resistente humane tuberkelbacteriën missen dit vermogen om ureum te hydrolyseren (TACQUET, 1954).

PAR. 3

VIRULENTIE VOOR CAVIAE

Onder virulentie wordt verstaan de graad van pathogeniteit van een bepaald micro-organisme voor een bepaalde gastheer, onder speciale experimentele voorwaarden, terwijl het begrip pathogeniteit omschreven kan worden als het vermogen van een micro-organisme een gastheer ziek te maken door zich daarin te vermeerderen (AMERICAN TRUDEAU SOCIETY, 1953).

Resultaten van dierproeven mogen dan ook nooit zonder meer worden overgedragen op een andere diersoort en zeker niet op de mens, daar de virulentie van een micro-organisme niet alleen wordt bepaald door het micro-organisme, doch eveneens door het macro-organisme wordt aangegeven. Ook bij dieren, die zowel in leeftijd als in gewicht met elkaar overeenstemmen, kunnen verschillen bestaan in natuurlijke weerstand, doch door meerdere dieren als proefobject te nemen kan men onderlinge verschillen enigszins nivelleren.

Bij de infectie van een cavia met tuberkelbacteriën zijn enkele fasen te onderscheiden, nl. 1e. het binnendringen van de bacteriën en het zich blijven handhaven tegen de afweer van het macro-organisme; 2e. vermeerdering van de bacteriën ter plaatse, gevolgd door verspreiding door het lichaam; 3e. vorming van haarden in de interne organen. Wanneer een cavia subcutaan wordt besmet met INH-sensibele tuberkelbacteriën ontstaat een tuberculeus absces op de plaats van de infectie, daarna treedt zwelling op van de regionale lymfklieren. De tuberculeuze infectie breidt zich geleidelijk verder uit, in de milt, lever en longen ontstaan macroscopische afwijkingen. Het dier daalt in gewicht en sterft tenslotte aan een progressieve tuberculose.

a. DE VIRULENTIE VAN INH-RESISTENTE TUBERKELBACTERIËN

Na besmetting met INH-resistente tuberkelbacteriën is het verloop anders. Een opvallend kenmerk van INH-resistente tuberkelbacteriën is de verminderde virulentie voor caviae. In 1952-1953 werd door

TUCZEK en SAUPE, MIDDLEBROOK en COHN, BARRY, CONALTY en GAFFNEY, BARNETT, BUSEBY en MITCHISON en door CONALTY reeds op deze eigenschap van INH-resistente tuberkelbacteriën gewezen. Na 1953 verschijnen hierover meerdere publicaties, o.a. van MEISSNER (1954), PEIZER (1954), KARLSON (1954), MORSE (1954), STEWART (1954), COHN (1954), MITCHISON (1954), RIST (1954, 1955), CONALTY (1955), GERNEZ-RIEUX (1955), BERNARD (1955), JENSEN (1955), GOULDING (1955), VISCHER (1956), KREBS (1956) en DAVID (1960).

INH-resistente tuberkelbacteriën zijn voor caviae niet avirulent, er is alleen sprake van een verminderde virulentie. MEISSNER (1959) wijst erop, dat INH-resistente tuberkelbacteriën weliswaar behoren tot de groep van weinig virulente mycobacteriën, doch dat hun virulentie groter is dan die van de BCG-stam, aviaire of atypische mycobacteriën.

De verminderde virulentie van INH-resistente tuberkelbacteriën voor caviae manifesteert zich als volgt:

1. *Overlevingstijd*

Dieren, welke waren besmet met INH-resistente tuberkelbacteriën bleven langer in leven dan die, welke met sensibele bacteriën waren geïnfecteerd (MEISSNER, 1954; PEIZER, 1954; KREBS, 1956; KRACHT en MEISSNER, 1957).

2. *Gewichtsverloop*

Na infectie met INH-sensibele bacteriën daalt het gewicht van de caviae; gedurende een infectie met INH-resistente tuberkelbacteriën blijft het gewicht stijgen (KREBS, 1956; VAN DIJK, 1957).

3. *Tuberculinereactie*

PEIZER (1954) vindt, dat de tuberculinereactie na infectie met homogeen resistente stammen ongeveer na 16 weken positief wordt. Een infectie met INH-sensibele bacteriën geeft na 5 weken een tuberculineomslag. GERNEZ-RIEUX (1955) daarentegen vindt ook na infectie met resistente bacteriën een positieve tuberculinereactie na ongeveer 6 weken.

4. *Macroscopische tuberculeuze afwijkingen*

Uit de literatuur blijkt, dat na intracutane, subcutane of intramusculaire infectie met INH-resistente bacteriën ter plaatse macroscopische afwijkingen ontstaan, doch dat macroscopische tuberculeuze afwijkingen in de interne organen nauwelijks voorkomen. Dit is in tegenstelling met INH-sensibele tuberkelbacteriën, die naast de lokale reacties uitgebreide tuberculeuze orgaanafwijkingen vertonen.

Naarmate een infectie met resistente bacteriën langer heeft geduurd worden minder afwijkingen in de organen gezien. De regressie van de tuberculeuze afwijkingen in de organen treedt op, nadat de infectie ongeveer 6-8 weken heeft bestaan (BERNARD, 1955; KRACHT en MEISSNER, 1957). KRACHT en MEISSNER beoordelen de virulentie van tuberkelbacteriën met de „Makroskopischer Befallsindex”. De macroscopische afwijkingen in de regionale lymphklieren, iliacale lymphklieren, milt, lever, longen en paratracheale lymphklieren worden samen geteld en aldus kan een indexcijfer worden verkregen. Bij infectie met INH-sensibele bacteriën stijgt dit indexcijfer naarmate de infectie langer duurt. De regressie van de macroscopische tuberculeuze afwijkingen bij resistente bacteriën is op te maken uit een daling van dit indexcijfer na de 6e-8e week.

In de eerste 3 weken is er geen verschil in afwijkingen tussen caviae geïnfecteerd met INH-sensibele of -resistente tuberkelbacteriën (DAVID, 1960), zodat men een lange observatieperiode moet nemen om de verminderde virulentie te kunnen beoordelen.

NIGOGHOSSIAN (1953) besmette caviae met een stam resistent voor 200 mcg INH. Van een verminderde virulentie bleek in zijn proeven niets, daar de observatieperiode te kort was (30 dagen).

Op grond van de uitgebreidheid van de macroscopische afwijkingen, die aanwezig zijn op het moment waarop het dier wordt onderzocht, is het mogelijk deze macroscopische afwijkingen in groepen te rangschikken.

GERNEZ-RIEUX (1955) maakt een indeling in 5 groepen:

- 0 - De cavia vertoont geen macroscopische afwijkingen.
- I - Tuberculeus absces op de injectieplaats; de regionale lymphklier is vergroot, doch niet verkaasd.
- II - Verkaasde regionale lymphklier; in de lever, milt en longen vindt men zeer geringe macroscopische afwijkingen.

- III - Verkaasde regionale lymphklier; in de interne organen meer macroscopische afwijkingen.
- IV - Gegeneraliseerde orgaan tuberculose.

De indeling van JENSEN (1955) vertoont kleine variaties op bovengenoemd schema. Hij kent 6 graderingen.

- I - Afwijkingen op de injectieplaats, al of niet met een geringe hyperplasie van de lieslymphklier. Een geringe verkazing in de klier kan aanwezig zijn.
- II - Regionale lymphklier is minstens erwtgroot met duidelijke verkazing.
- III - De lumbale en portale lymphklieren zijn verkaasd.
- IV - Matig uitgebreide tuberculose in milt, lever en longen.
- V - Ernstige graad van gegeneraliseerde tuberculose.
- VI - De cavia sterft tengevolge van uitgebreide tuberculose binnen 2 maanden.

De volgende indeling wordt in „Beatrixoord” gebruikt (VAN DIJK, 1957):

- 0 - De Mantoux-reactie van de cavia is positief. Macroscopische afwijkingen worden niet gevonden.
- I - De Mantoux-reactie is positief; er is pus op de plaats van injectie; de regionale lieslymphklier is vergroot, doch niet verkaasd. De lever, milt en longen zijn macroscopisch normaal.
- II - Als I, doch tevens een verkaasde lymphklier en hoogstens in totaal 3 haarden aan het oppervlak van lever, milt of longen.
- III - Als II, doch meer macroscopische afwijkingen in de interne organen.
- IV - Algehele gegeneraliseerde tuberculose.

Bij deze indeling wordt het tijdsinterval tussen infectie en onderzoek van het dier steeds vermeld. Gewoonlijk worden de caviae 3 maanden na infectie onderzocht.

GERNEZ-RIEUX (1955) noemt tuberkelbacteriën duidelijk verminderd virulent, wanneer deze bacteriën bij caviae slechts aanleiding geven tot het ontstaan van afwijkingen als genoemd in groep 0 t/m II, volgens zijn indeling. Hoog INH-resistente bacteriën veroorzaken afwijkingen als in groep 0 t/m II, afwijkingen als in groep III en IV worden zelden

waargenomen bij infectie met INH-resistente bacteriën. INH-gevoelige culturen daarentegen geven afwijkingen behorende bij groep III en IV.

Ook in het laboratorium van „Beatrixoord” zijn een aantal INH-resistente culturen bekend, die als teken van verminderde virulentie slechts aanleiding geven tot afwijkingen, zoals die bij groep 0 t/m II van onze indeling voorkomen. Deze caviae werden 3 maanden na infectie onderzocht (VAN DIJK, 1957; MULDER, 1957).

5. *Histologische tuberculeuze afwijkingen*

VISCHER (1956) maakte bij infectie van caviae een indeling van de histologische afwijkingen in de lymphklieren, milt, lever en longen en wel als volgt:

- 0 - Geen afwijkingen.
- I - Enkele epitheloidceltuberkels.
- II - Talrijke tuberkels zonder necrose.
- III - Vele tuberkels met verkazing.

Bij het histologisch onderzoek vond VISCHER duidelijk minder sterke veranderingen na infectie met INH-resistente bacteriën dan na infectie met sensibele. Het viel deze onderzoeker op, dat tamelijk veel microscopische tuberculeuze haarden in de organen werden gevonden, terwijl het macroscopisch beeld geen afwijkingen opleverde. Hij onderzocht de caviae nadat de infectie 6 weken bestond.

MITCHISON (1954) vond eveneens in de interne organen microscopisch tuberkels, terwijl de macroscopie normaal was. BARNETT (1953) zag 6 weken na infectie met INH-sensibele of -resistente tuberkelbacteriën microscopische afwijkingen in de interne organen; na 10 weken was bij een infectie met resistente bacteriën het histologisch beeld weer normaal.

6. *Orgaancultuur*

Na infectie met INH-resistente bacteriën kunnen in een geringer percentage tuberkelbacteriën uit de organen worden gekweekt dan na infectie met sensibele (MEISSNER, 1954). Zij toonde dit aan met de „Kultureller Befallsindex”. De positieve orgaanculturen uit de afzonderlijke cavia-organen zijn bij elkaar opgeteld; in totaal werden 7 organen per dier onderzocht, dus index maximaal 7. Bij infectie met sensibele bacteriën was de index gemiddeld 6,6, bij resistente gemiddeld 1,9.

Verder vond MEISSNER (1959) een afname van het aantal dieren met positieve orgaankweken, naarmate een infectie met resistente bacteriën langer had bestaan. Twee maanden na de besmetting had 2/3 deel der dieren nog een positieve orgaankweek, na drie maanden was dit verminderd tot 1/3. Tien maanden na infectie was geen der orgaan-culturen meer positief.

De regressie van de macroscopische afwijkingen ziet zij als een gevolg van het afsterven van INH-resistente tuberkelbacteriën in de organen. De aanwezigheid van kweekbare INH-resistente tuberkelbacteriën in de interne organen wijst erop, dat verspreiding van resistente bacteriën vanuit de infectieplaats op kan treden, doch deze bacteriën hebben volgens MEISSNER een „verminderd invasief vermogen”.

RIST (1955) vond de positieve orgaankweken na infectie met resistente bacteriën in de eerste twee maanden van de infectie.

b. DE VIRULENTIE VAN MENGPOPULATIES

Uit de literatuur van de in het begin van par. 3 (bladz. 9) genoemde onderzoekers blijkt, dat alleen homogene en voor hoge concentraties INH-resistente tuberkelbacteriënculturen een verminderde virulentie voor caviae bezitten.

Mengpopulaties van sensibele en resistente tuberkelbacteriën veroorzaken een progressief verloop van de tuberculose en zullen het dier doen sterven. Vooral MEISSNER heeft hierop gewezen. Wanneer in de cultuur waarmee de cavia wordt besmet INH-sensibele naast INH-resistente tuberkelbacteriën voorkomen, zullen de INH-sensibele zich in het dier sneller vermeerderen dan de resistente en zodoende de resistente overwoekeren. De tuberculose, die bij het dier ontstaat zal dus verlopen alsof het met sensibele tuberkelbacteriën was geïnfecteerd. Het is derhalve van groot belang bij dergelijke dierproeven uit te gaan van een homogeen resistente cultuur. Om zeker te zijn, dat de tuberculose veroorzaakt werd door resistente bacteriën, zal men resistentiebepalingen moeten doen van de uit de cavia teruggekweekte bacteriën.

Zelfs bij aanwezigheid van geringe aantallen sensibele tuberkelbacteriën in een mengpopulatie zullen deze zich in de cavia zo snel vermeerderen, dat ze tenslotte de overhand krijgen. MEISSNER (1956) geeft hierover enkele waarden. Wanneer in experimenteel samen-

gestelde mengpopulaties van INH-sensibele en INH-resistente bacteriën (afkomstig van dezelfde stam) 2% sensibele kiemen voorkomen, is dit gering percentage reeds voldoende om in het verloop van enkele maanden in de organen van het besmette dier te overwegen en orgaan-tuberculose te geven. Ook zeer geringe aantallen INH-sensibele bacteriën in een mengpopulatie met INH-resistente kunnen door hun snellere groei op de duur in de cavia aanleiding geven tot uitgebreide orgaan-tuberculose, als ware het dier alleen met sensibele bacteriën geïnfecteerd. Wordt een cavia geïnfecteerd met een mengpopulatie bestaande uit 1-10 INH-sensibele bacteriën op 100.000-1.000.000 resistente bacteriën, dan worden tot 7 maanden INH-resistente bacteriën in de organen aangetroffen. Alle daarna gestorven dieren herbergen slechts sensibele kiemen, zoals MEISSNER (1959) heeft beschreven.

In 1953 bestreed PEIZER de verminderde virulentie van INH-resistente tuberkelbacteriën. Hij infecteerde in dat jaar echter met niet homogeen resistente culturen. In 1954 daarentegen kon PEIZER de virulentievermindering wel waarnemen toen hij de caviae met homogeen resistente culturen besmette.

Het begrip homogene resistentie verdient even vermelding. Een homogeen resistente cultuur wil niet zeggen, dat alle daarin voorkomende bacteriën tot eenzelfde hoogte resistent zijn, maar dat alle daarin aanwezige bacteriën tenminste resistent zijn voor de aangegeven waarde, bijv. een voor 1 mcg homogeen resistente stam kan bacteriën bevatten, die resistent zijn voor 10 mcg INH/ml. Om een cultuur homogeen resistent te maken tegen een bepaalde concentratie INH, zal men een resistente populatie enkele keren moeten overenten op een voedingsbodem, die INH in die concentratie bevat. Volgens BARNETT (1953) is drie keer overenten hiervoor voldoende.

c. INVLOED VAN DE RESISTENTIEGRAAD OP DE VIRULENTIE

De verminderde virulentie van INH-resistente tuberkelbacteriën wordt vooral gezien bij hogere graden van resistentie. Er bestaat een correlatie tussen de graad van resistentie en de mate van de virulentievermindering (MEISSNER, 1956; MITCHISON, 1954; RIST, 1954, 1955; KREBS, 1956).

Volgens MEISSNER bezitten slechts 50% van de stammen, welke resistent zijn voor 0,1 en 1 mcg INH een verminderde virulentie. Daarentegen zijn alle stammen, die resistent zijn voor 10 mcg INH verminderd virulent voor de cavia.

d. CORRELATIE TUSSEN INH-RESISTENTIE, KATALASE-ACTIVITEIT EN VERMINDERDE VIRULENTIE

Zoals in par. 2b (bladz. 6) reeds werd genoemd, bestaat er een relatie tussen de INH-resistentie en de katalase-activiteit. Deze correlatie kan doorgetrokken worden naar de mate van virulentievermindering (MEISSNER, 1956; PEIZER, 1955; MEISSNER en BÖNICKE, 1957; COHN, 1954; MIDDLEBROOK, 1954; VAN DIJK, 1957).

Er bestaat dus een koppeling tussen de graad van INH-resistentie, katalase-activiteit en virulentievermindering. Bij de hogere graden van resistentie (> 10 mcg INH/ml) bestaat een verminderde katalase-activiteit en tevens een verminderde virulentie voor de cavia. Bij lagere graden van resistentie kan deze samenkoppeling van eigenschappen ontbreken.

De resistentie voor INH, katalase-activiteit en de virulentievermindering zijn erfelijke eigenschappen, welke gebonden zijn aan de afzonderlijke tuberkelbacterie (MEISSNER, 1959).

Wanneer een cultuur INH-resistent is, de katalase-activiteit is afgenomen en een verminderde virulentie voor de cavia bestaat, dan blijven deze eigenschappen bestaan ook na meerdere overentingen (20-25 keer) op INH-vrije voedingsbodems of na passages door caviae. Treedt in de cultuur een verandering op van één dezer kenmerken, dan is dit een gevolg van de aanwezigheid van een gering aantal sensibele bacteriën in de oorspronkelijke cultuur (MEISSNER, 1959; RIST, 1955).

Ook in het laboratorium van „Beatrixoord” zijn INH-resistente, verminderd virulente culturen bekend, die ondanks herhaalde overentingen en caviapassages deze eigenschappen blijven behouden.

e. INVLOED VAN DE INFECTIEWIJZE EN DE INFECTIEDOSIS OP DE VIRULENTIE VAN INH-RESISTENTE TUBERKELBACTERIËN

De virulentievermindering van homogeen, hoog INH-resistente tuberkelbacteriënculturen voor caviae is onafhankelijk van de wijze waarop het dier geïnfecteerd wordt. De virulentievermindering blijkt zowel na intracutane, subcutane als intramusculaire besmetting (COHN, 1954; MEISSNER, 1956; GERNEZ-RIEUX, 1955; BERNARD, 1955; PEIZER, 1954; CONALTY, 1955; KARLSON, 1954; BARNETT, 1953), doch ook na intraperitoneale besmetting (KARLSON, 1954; GERNEZ-RIEUX, 1955)

en na besmetting via de luchtwegen (MEISSNER, 1956; BERNARD, 1955; COHN, 1954; ZAIDI, 1955).

Na intraveneuze besmetting van caviae met INH-resistente bacteriën is de virulentievermindering minder duidelijk. Een deel der caviae sterft na intraveneuze infectie met hoge dosis INH-resistente tuberkelbacteriën met uitgebreide lever- en milttuberculose (MEISSNER, 1959). BERNARD (1955) beschrijft eveneens dat caviae, die intraveneus worden geïnfecteerd, met hoge dosis (1 mg) INH-resistente bacteriën binnen 4 weken sterven.

Een veel gebruikte infectiedosis bij caviae is 0,01 mg vochtig gewicht (MEISSNER, 1954; RIST, 1954; BERNARD, 1955; VISCHER, 1956; KREBS, 1956). Ook bij hogere doseringen van INH-resistente tuberkelbacteriën blijkt de verminderde virulentie voor caviae. Infectiedoses van 0,5 mg (MORSE, 1954), 0,1 mg (KARLSON, 1954) en 0,3 mg (GERNEZ-RIEUX, 1955) worden hierbij opgegeven.

Volgens MEISSNER (1954, 1955) is de mate van virulentievermindering voor caviae wel afhankelijk van de dosis INH-resistente bacteriën. Bij een hogere infectiedosis (1 mg) worden meer macroscopische orgaanafwijkingen gevonden, doch deze zijn van voorbijgaande aard en voeren niet tot de dood.

f. DE INVLOED VAN VOOR TUBERCULOSE ONGUNSTIGE FACTOREN OP DE VIRULENTIE VAN INH-RESISTENTE TUBERKELBACTERIËN

Wat gebeurt er, wanneer men caviae, die besmet zijn met INH-resistente tuberkelbacteriën blootstelt aan voor tuberculose ongunstige factoren? KRACHT en MEISSNER (1956) vonden dat cortison het verloop van een infectie met INH-sensibele tuberkelbacteriën bij caviae versnelde. Wanneer de dieren echter werden besmet met resistente bacteriën werden de geringe tuberculeuze afwijkingen niet geactiveerd door cortison, onafhankelijk van de omstandigheid of het hormoon gelijktijdig met de infectie of na een bepaalde tijd was gegeven.

ZAIDI (1955) bracht caviae in ongunstige omstandigheden door de dieren na besmetting met INH-resistente bacteriën gedurende enige tijd kolenstof te laten inhaleren. Na een intratracheale infectie met een voor 10 mcg/INH resistente, katalase-negatieve cultuur ontstonden in de longen tuberculeuze haarden, die na verloop van tijd teruggingen. Het inhaleren van kolenstof bleek een zeer ongunstige invloed op de longtuberculose te hebben, er ontstonden dan uitgebreide caverneuze processen.

VIRULENTIE VAN INH-RESISTENTE TUBERKELBACTERIËN
VOOR ANDERE PROEFDIEREN

We moeten ons vervolgens afvragen of INH-resistente tuberkelbacteriën ook verminderde virulentie bij andere proefdieren vertonen. Naast de cavia wordt de muis het meest als proefdier gebruikt. Bij beide diersoorten bestaat verschil in wijze van infecteren, caviae worden meestal subcutaan besmet, terwijl muizen vrijwel steeds intraveneus worden geïnfecteerd. Bovendien is de infectiedosis bij muizen hoger dan bij caviae.

MEISSNER (1959) infecteert muizen met 0,1-1 mg vochtig gewicht. Andere infectiedoses voor muizen zijn: 2 mg (KARLSON, 1954); 0,5 mg (JENSEN, 1955); 0,8 mg (HIRSCH, 1956) en 0,3-1,2-1 mg (BARNETT, 1953).

Meerdere onderzoekers wijzen erop, dat INH-resistente tuberkelbacteriën virulent voor muizen zijn (KARLSON, 1952, 1954; MORSE, 1954; COHN, 1954; JENSEN, 1955; RIST, 1955; GOULDING, 1955; MEISSNER, 1956, 1959; CONALTY, 1955; HIRSCH, 1956).

BLOCH (1953) infecteert muizen met INH-resistente tuberkelbacteriën uit het sputum. Er wordt een duidelijke virulentie van deze culturen voor de muizen gevonden. Het is echter waarschijnlijk, dat er niet is besmet met homogeen resistente stammen.

GERNEZ-RIEUX (1955), NOUFFLARD (1955), BERNARD (1955) en BARNETT (1953) vinden de overlevingstijd van muizen, die met INH-resistente bacteriën zijn geïnfecteerd, langer dan na infectie met sensibele kiemen. Op de duur ontstaan echter wel macroscopische tuberculeuze afwijkingen in de interne organen en sterft het dier tenslotte aan de tuberculose.

Het verschil in wijze van infecteren en de hogere infectiedosis bij muizen zou het verschil in gedrag van INH-resistente tuberkelbacteriën bij cavia en muis kunnen verklaren. Na intraveneuze besmetting met hoge dosis INH-resistente tuberkelbacteriën was ook bij caviae de virulentievermindering niet aantoonbaar (zie bladz. 16).

Vergeleken met INH-sensibele zijn INH-resistente tuberkelbacteriën minder virulent voor Syrische goudhamsters (GERNEZ-RIEUX, 1955); voor varkens, woestijnmuizen en apen (BERNARD, 1955) en voor konijnen (MEISSNER, 1959).

HET HISTOLOGISCH BEELD VAN DE TUBERCULEUZE AFWIJKINGEN
VEROORZAAKT DOOR INH-RESISTENTE TUBERKELBACTERIËN

Bestaan er histologische verschillen in de tuberculeuze afwijkingen veroorzaakt door INH-sensibele of INH-resistente tuberkelbacteriën?

KRACHT en MEISSNER (1957, 1958) vonden bij het microscopisch onderzoek van longresectiepreparaten in de tuberculeuze haarden regressieve veranderingen in de zin van bindweefselvorming, wanneer in deze haarden INH-resistente, voor caviae verminderd virulente tuberkelbacteriën voorkwamen. Zij vonden een correlatie tussen de structuur van de haard en het resistentiepatroon van de daarin voorkomende tuberkelbacteriën. Specifiek granulatiweefsel (epitheloidcellen en reuscellen) werd vooral gezien in haarden, waarin virulente, sensibele kiemen werden aangetoond. In de haarden met INH-resistente, voor caviae verminderd virulente bacteriën, overheersten regressieve veranderingen; bindweefselvorming rond en hyalinisering van de tuberkels stonden op de voorgrond. De correlatie tussen haardstructuur en resistentie van de daarin voorkomende tuberkelbacteriën is vooral waargenomen bij de kleine kaashaarden, echter niet in cavernewanden.

KRACHT en PLIQUETT (1960) besmetten caviae subcutaan met 0,01 mg INH-resistente tuberkelbacteriën. Deze bacteriën groeiden op de voedingsbodems waaraan minstens 10 mcg INH per ml was toegevoegd. In de levers merkten zij met de reticulinekleuring volgens Gomori zg. Retothelknötchen op. Bij infectie met INH-sensibele bacteriën zijn deze knobbeltjes niet waargenomen. Zij maken onderscheid tussen primaire en secundaire Retothelknötchen. De primaire zouden ontstaan uit het ter plaatse aanwezige rethel, speciaal uit de sterzellen van KUPFER. Deze primaire knobbeltjes zijn in de regel vrij van argyrophiele vezels, onscherp begrensd en liggen in de buurt van vaten. Secundaire Retothelknötchen ontstaan door het verschijnen van reticulumcellen aan de periferie, later ook in het centrum van de epitheloidceltuberkels. Deze cellen met hyperchromatische kernen vervangen steeds meer de epitheloidcellige structuren, waardoor een omvorming van specifiek in een meer onspecifiek ontstekingsweefsel ontstaat.

De primaire Retothelknötchen zijn door hen in verband gebracht met veranderingen in de biologische eigenschappen van de verwekker. De secundaire Retothelknötchen, welke meest argyrophiele vezels be-

vatten, zouden eigenlijk niets anders zijn dan een transformatie van de epitheloidceltuberkels.

VINK, MANTEN en BEKKER (1956) vonden bij caviae, die met 1 mg voor 10 mcg INH-resistente bacteriën subcutaan waren geïnfecteerd, tekenen van genezing in de vorm van bindweefselafkapseling der tuberkels of bindweefselhaardjes met enkele epitheloidcellen.

Door DE FIGUEIREDO, DE PAOLA en DIAS (1957, 1960) wordt op het voorkomen van epitheloide cellen en reuscellen op atypische plaatsen gewezen. Zij zagen in longresectiepreparaten epitheloidcellen en reuscellen in de vrije alveolaire ruimte en in de bronchioli, terwijl toch de klassieke plaats van deze cellen in de tuberkels en aan de rand van kaashaarden is. Deze atypische localisatie is door hen in verband gebracht met INH-resistentie. Tevens maken zij melding van het voorkomen van epitheloidcelpneumonie, een toestand waarbij de alveolen gevuld zijn met epitheloiden en reuscellen, wanneer caviae worden geïnfecteerd met INH-resistente tuberkelbacteriën.

DAVID en ALEMQUER (1960) hebben bij hun caviaproeven deze atypische localisatie van de specifieke cellen en de epitheloidcelpneumonie nooit kunnen waarnemen.

PAR. 6

INH-RESISTENTE TUBERKELBACTERIËN BIJ DE MENS

In deze paragraaf zal worden nagegaan hoe in de literatuur het probleem van de virulentie van INH-resistente tuberkelbacteriën voor de mens benaderd wordt. Virulentieproeven bij de mens zijn uiteraard onmogelijk. Een indruk over de virulentie van INH-resistente tuberkelbacteriën zou bij de mens op tweeërlei wijze verkregen kunnen worden, nl.:

- a. Men zou moeten nagaan hoe frequent primaire infecties ontstaan na contact met een patiënt, die resistente tuberkelbacteriën uitscheidt.
- b. Men zou conclusies kunnen trekken uit het verloop van de longtuberculose bij patiënten, waarbij de bacteriën resistent zijn geworden.
- a. Primaire tuberculose na besmetting met INH-resistente tuberkelbacteriën.

De vraag is dus hoe frequent INH-resistente tuberkelbacteriën aan-

leiding tot een primaire besmetting geven. Uit de literatuur blijkt, dat een dergelijke besmetting weinig wordt waargenomen. Primaire infecties door INH-resistente, voor caviae verminderd virulente, tuberkelbacteriën komen weliswaar voor, doch in verhouding tot infecties met sensibele bacteriën in een zeer laag percentage.

MEISSNER (1959) vond 1 geval op 2900 sputumculturen, d.i. 0,03%, bij kinderen was dit percentage 0,5%.

Een besmetting met primair INH-resistente tuberkelbacteriën bij kinderen treedt volgens GERBEAUX en medewerkers (1962) frequenter op dan MEISSNER aangeeft. Een duidelijke primaire INH-resistentie is door hen waargenomen bij 8,4% van 107 onbehandelde kinderen. Dit percentage is gebaseerd op een resistentie voor 1 mcg INH/ml. Namen ze een lagere resistentiegrens (0,1 mcg INH/ml) dan is het 13%. Sommige INH-resistente stammen waren verminderd virulent voor de cavia.

Van de 974 door Fox (1957) onderzochte culturen van nieuw gediagnostiseerde, onbehandelde gevallen van longtuberculose bleken 7 (= 0,7%) resistent voor INH.

CHAVES en medewerkers (1956) vonden bij 631 nieuwe gevallen van longtuberculose in New York City bij 5 patiënten (0,8%) primaire resistentie voor 5 mcg INH. Bij een dergelijk onderzoek in 1955 werd door hen in 2,3% primaire resistentie gevonden.

REISS en TOWNSEND (1957) onderzochten het sputum van 322 niet behandelde patiënten. Ze vonden 133 keer positief sputum. Van deze 133 culturen zijn 33 (= 24%) resistent voor 5 mcg INH. (Virulentie van deze resistente culturen voor caviae wordt niet vermeld, mogelijk zijn deze culturen niet homogeen resistent en kan daardoor het hoge percentage worden verklaard).

De U.S. PUBLIC HEALTH SERVICE (1964) verrichtte in 1961-1962 een groot onderzoek over het voorkomen van primaire resistentie. 2400 sputumculturen van nieuw gediagnostiseerde, volwassen tuberculosepatiënten werden op hun resistentie onderzocht. De percentages primaire INH-resistentie wisselen met de criteria, die men daarvoor aanlegt. Wanneer een cultuur INH-resistent wordt beschouwd indien 51-200 kolonies groeien bij aanwezigheid van 0,2 mcg INH/ml (U.S. Public Health Service), dan bedroeg het percentage primaire INH-resistentie 1,6%. Gebruikt men de criteria van de Veterans Administration (geen groei bij 5 mcg INH/ml of op de buis met 1 mcg INH/ml gelijke groei als op de controle), dan is dit percentage 0,9%. Volgens

de normen van de British Research Council (20 of meer kolonies op de buis met 1 mcg INH/ml) is het percentage primaire INH-resistentie bij dit onderzoek 1,2%.

HOBBS en medewerkers (1964) deden in 1962-1963 een dergelijk onderzoek. Van 1204 sputumculturen bleken 47 populaties 1 mcg of meer INH per ml voedingsbodem nodig te hebben om in hun groei te worden geremd, d.i. een primaire resistentie van 3,9%. Uit deze twee grote onderzoeken blijkt dus wel, dat, althans bij deze groepen onderzochte personen, primaire INH-resistentie in de Verenigde Staten weinig voorkomt.

Primaire besmetting met INH-resistente tuberkelbacteriën is bij de patiënten in het sanatorium „Beatrixoord” zelden waargenomen. Het aantal primaire INH-resistente tuberkelbacteriënculturen voorkomend in het sputum van de in de jaren 1956 tot 1960 nieuw opgenomen, onbehandelde patiënten bedroeg slechts $\pm 1\%$ van het totaal der positieve kweken, welke bij opname werden gevonden. Deze culturen waren laag-resistent. Het merendeel dezer gevonden resistente kweken bleek virulent voor een cavia, zodat aangenomen mag worden, dat de besmetting niet heeft plaats gehad met homogeen resistente culturen (MULDER, 1962).

De percentages primaire besmettingen met INH-resistente tuberkelbacteriën zijn dus vrij laag. Dit percentage is afhankelijk van de eisen, die aan het begrip resistentie worden gesteld. Bij bovengenoemde onderzoeken wordt meestal alleen de concentratie INH in de voedingsbodem, waarbij de tuberkelbacteriën nog groeien, aangegeven, de virulentie van de bacteriën voor de caviae is echter niet altijd vermeld. Dat het percentage primaire besmettingen met INH-resistente tuberkelbacteriën zo laag is, komt natuurlijk mede, doordat het aantal besmettingsbronnen met INH-resistente, voor cavia verminderd virulente, tuberkelbacteriën in verhouding tot bronnen met INH-sensibele, voor cavia virulente, bacteriën veel geringer is. Absolute getallen over deze verhouding zijn niet bekend.

Een zekere conclusie over de virulentie van INH-resistente, voor caviae verminderd virulente, bacteriën voor de mens is aan de hand van het voorkomen van primaire infecties met deze bacteriën moeilijk te maken.

b. Het verloop van longtuberculose nadat de bacteriën resistent zijn geworden.

Uit het verloop van een tuberculeus longproces bij een patiënt bij wie in het sputum INH-resistente, voor caviae verminderd virulente, tuberkelbacteriën voorkomen, kan enigszins inzicht worden verkregen over de virulentie van deze bacteriën voor de mens. Een aantal moeilijk uit te schakelen complicerende factoren moeten hierbij in aanmerking worden genomen, zoals het verschil in natuurlijke weerstand van de patiënt en de behandeling, die deze patiënten krijgen in de vorm van bedrust en toediening van andere tuberculostatica.

Over het verloop van de longtuberculose bij patiënten met in het sputum voor caviae verminderd virulente tuberkelbacteriën, bestaan uiteenlopende meningen.

Het voorkomen van deze tuberkelbacteriën in het sputum van een patiënt betekent niet zonder meer een gunstige prognose (GERNEZ-RIEUX, 1955; RIST, 1954; BERNARD, 1957). Bij dergelijke patiënten bestaat meestal een ver voortgeschreden caveuze longtuberculose.

BERNARD (1957) beschrijft 31 patiënten met in het sputum hoog INH-resistente, katalase-negatieve, voor caviae verminderd virulente, tuberkelbacteriën. Deze patiënten zijn 3 tot 24 maanden vervolgd. Op het moment, dat een verslechtering van het röntgenbeeld optrad (groter worden van cavernes, optreden van nieuwe afwijkingen) zijn de in het sputum voorkomende tuberkelbacteriën op hun resistentie onderzocht. Het bleek nu, dat de bacteriën resistent waren gebleven.

COATES en medewerkers (1953) zagen een verslechtering van het röntgenbeeld of het weer positief worden van het sputum bij patiënten, die alleen INH kregen, wanneer de tuberkelbacteriën resistent voor dit middel werden. Of deze tuberkelbacteriën ook verminderd virulent voor caviae waren, is niet vermeld.

Dat INH-resistente tuberkelbacteriën bij de mens een progressieve tuberculose kunnen veroorzaken is eveneens door COHEN en GLINSKY (1955) waargenomen. Volgens hen waren het vooral bestaande afwijkingen die zich uitbreiden, vorming van nieuwe haarden werd wel waargenomen, doch minder frequent. Deze uitbreiding is gezien bij patiënten met in het sputum bacteriën resistent voor 5 mcg INH. Virulentie van deze sputumculturen bij caviae is niet onderzocht.

GERNEZ-RIEUX (1955) wijst erop, dat INH-resistente bacteriën hun pathogene activiteit behielden in de buurt van tuberculeuze haarden, doch men moet dan zeker weten, dat deze haarden geen INH-sensibele stammen bevatten. De experimentele waarnemingen over een verminderde virulentie van INH-resistente tuberkelbacteriën corresponderen

niet met de menselijke pathologie. Het voorkomen van INH-resistente, voor caviae verminderd virulente, tuberkelbacteriën in het sputum van een patiënt geeft geen aanwijzing voor een gunstige prognose.

FOX en SUTHERLAND (1955) zagen het optreden van INH-resistentie bij de patiënt als een therapeutisch ongunstige factor, zelfs wanneer de sputumculturen resistent zijn voor 10 mcg INH.

De klinische waarnemingen van BALDAMUS en PONICK (1956) aan de hand van 220 patiënten met caverneuze longtuberculose en in het sputum INH-resistente, voor caviae verminderd virulente, tuberkelbacteriën zijn hiermede in overeenstemming. De prognose van deze patiënten was slecht, hoewel het proces gedurende langere tijd stationnair kon blijven. De ontwikkeling van INH-resistentie wordt door hen als een ongunstig teken beschouwd.

Uit het onderzoek van PONGOR en BERENCSI (1963) blijkt, dat de prognose van patiënten met uitgebreide caverneuze longtuberculose, waarbij in het sputum constant INH-resistente, katalase-negatieve tuberkelbacteriën voorkomen, zonder verdere antituberculeuze therapie ongunstig is.

Op grond van de onderzoeken in Madras concludeert Fox (1962), dat het voorkomen van INH-resistente, ja zelfs katalase-negatieve tuberkelbacteriën in het sputum gevaarlijk is voor de patiënt: de ziekte zal zich waarschijnlijk uitbreiden, ook wanneer aan de voortgezette behandeling INH blijft toegevoegd om de eventueel optredende INH-sensibele tuberkelbacteriën te onderdrukken. Hoewel de INH-resistente tuberkelbacteriën verminderd virulent zijn voor de cavia en bij dit dier aanleiding geeft tot een „self-limiting” is dit volgens Fox zeker niet het geval bij de mens.

Bij kinderen kan, zoals uit de onderzoeken van GERBEAUX (1962) blijkt, een primaire besmetting met INH-resistente, voor caviae verminderd virulente tuberkelbacteriën optreden. Het verloop van deze primaire tuberculose verschilde niet van die veroorzaakt door INH-sensibele bacteriën. Ze beschrijven één geval van een ernstige meningitis tuberculosa door INH-resistente, voor de cavia verminderd virulente, bacteriën.

Uit vorengenoemde blijkt dus wel, dat meerdere onderzoekers een verminderde virulentie van INH-resistente tuberkelbacteriën voor de mens niet accepteren.

MEISSNER (1957) daarentegen meent toch, dat INH-resistente tuberkelbacteriën in zekere mate ook voor de mens verminderd virulent

zijn. Op grond van het zeer weinig voorkomen van primaire infecties met INH-resistente tuberkelbacteriën en het onderzoek van longresectiepreparaten, dat ze samen met KRACHT heeft verricht (zie par. 5), schrijft ze: „Wir möchten daher den Standpunkt vertreten, dass die am Meerschweinchen zu beobachtende Virulenzschädigung der Stämme unter INH Behandlung auch am Menschen zur Auswirkung kommt, allerdings nicht immer so hochgradig wie am Meerschweinchen und auch nicht unbegrenzt, weil sie von dem Vorhanden sein ausreichender makroorganismischer Abwehrfähigkeiten abhängig ist”.

OESTREICHER en medewerkers (1955) beweren, dat progressieve longtuberculose nauwelijks voorkomt, wanneer in het sputum INH-resistente tuberkelbacteriën worden gevonden. Zij behandelden patiënten met voor 1 mcg INH resistente bacteriën in het sputum gedurende lange tijd (gemiddeld 1 jaar) met INH. Slechts in enkele gevallen is progressie gezien. Ons inziens mag men het uitblijven van progressie niet zonder meer toeschrijven aan de aanwezigheid van INH-resistente bacteriën. Bij deze lage graad van resistentie is het mogelijk, dat de cultuur niet homogeen resistent is, m.a.w. dat er sensibele kiemen in voor kunnen komen, waarop INH therapeutisch effect heeft, waardoor geen verdere progressie optreedt.

In het sanatorium „Beatrixoord” zijn eveneens patiënten waargenomen met in het sputum INH-resistente tuberkelbacteriën. Deze bacteriën gaven bij caviae aanleiding tot geringe macroscopische afwijkingen (groep 0 t/m II; bladz. 11). Meestal bestond bij deze patiënten een uitgebreide caverneuze longtuberculose. Het tuberculeus proces kon in dergelijke gevallen gedurende lange tijd stationnair blijven. Soms is vergroting van de cavernes gezien en in enkele gevallen ontstonden nieuwe haarden (MULDER, 1957).

Uit de literatuur en eigen waarnemingen blijkt wel, dat een verminderde virulentie van hoog INH-resistente tuberkelbacteriën, zoals die bij de caviae wordt waargenomen, niet zonder meer in de menselijke pathologie aannemelijk is.

Wanneer bij aanwezigheid van hoog INH-resistente tuberkelbacteriën in het sputum, tuberculeuze longprocessen zich gaan uitbreiden kan toch moeilijk gesproken worden van een verminderde virulentie van dergelijke bacteriën.

Hoofdstuk II

INVLOED VAN INH OP DE TUBERCULEUZE INFECTIE IN HET DIEREXPERIMENT

PAR. 1

DE WERKING VAN INH IN VITRO

Wat betreft de invloed, die antibacteriële stoffen op micro-organismen hebben, moeten de begrippen bactericidie en bacteriostasis worden genoemd. Een stof met bactericide werking doodt zowel de bacteriën „in rust” als de bacteriën, die zich vermeerderen. De sterkte van de werking wordt mede bepaald door de concentratie van de bactericide stof. Bacteriostatische stoffen zijn niet in staat „rustende” of zich vermeerderende bacteriën te doden; deze stoffen belemmeren slechts de groei van de micro-organismen. Deze groeiremming kan direct of na een latente periode optreden en is afhankelijk van de concentratie van de bacteriostatische stof. Op den duur echter kan een bacteriostatische stof aanleiding geven tot irreversibele beschadiging van de bacterie, waardoor deze afsterft (BARTMANN, 1963).

BARNETT, BUSHBY en MITCHISON (1953) schrijven INH een bactericide werking toe. CANETTI (1954, 1960) is dit eveneens van mening, doch merkt daarbij op, dat een groot aantal, echter niet alle, tuberkelbacteriën gedood worden.

MACKANESS (1953) en SCHAEFER (1954) nemen een bactericide werking aan, doch alleen op zich vermeerderende bacteriën.

Naar de mening van GERNEZ-RIEUX (1953) en BÖNICKE (1956) heeft INH een bacteriostatische activiteit.

Een bijzonder standpunt wordt ingenomen door VELTMAN (1955) en GIERHAKKE (1955). Zij zien de virulentieafname van tuberkelbacteriën onder invloed van INH als een „wesentlich Bestandteil der spezifischen Wirkung des INH”.

BARTMANN (1963) heeft bactericidie en bacteriostasis met betrekking tot INH verlaten en voert hiervoor het begrip „degeneratieve werkingswijze” in. Degeneratief werkende stoffen hebben met bacteriostatica gemeen, dat ze geen of nauwelijks invloed hebben op „rustende” bacteriën. Wanneer zich vermeerderende bacteriën in contact komen met een degeneratief werkende stof, gaat de vermeerdering nog enkele

generaties door, doch tenslotte gaan de bacteriën dood. De snelheid van afsterven van de zich vermeerderende bacteriën is onafhankelijk van de concentratie. (Dit in tegenstelling tot bactericide stoffen). Volgens BARTMANN zou INH dus ingrijpen op die stofwisselingsprocessen, die voor de vermeerdering van de tuberkelbacteriën van belang zijn. Dit leidt niet tot een onmiddellijk afsterven van de tuberkelbacterie, maar tot degeneratieve beschadiging, die in de volgende bacteriegeneraties tot de dood van het micro-organisme aanleiding geeft.

PAR. 2

FACTOREN DIE HET THERAPEUTISCH EFFECT VAN INH BIJ TUBERCULOSE DOOR INH-SENSIBELE TUBERKELBACTERIËN BEÏNVLOEDEN

Het therapeutisch effect van INH bij een tuberculeuze infectie in het dierexperiment wordt door verschillende factoren beïnvloed. De therapeutische resultaten kunnen gewaardeerd worden door de beoordeling van overlevingstijd, gewichtsverloop van het proefdier, macroscopie en microscopie van de organen, kweekbaarheid van de bacteriën uit deze organen en de daling van het aantal tuberkelbacteriën in de organen.

De voornaamste factoren, die het effect kunnen beïnvloeden worden hieronder afzonderlijk genoemd.

a. INFECTIEDOSIS

De resultaten van een vroegtijdig begonnen INH-therapie worden ten eerste beïnvloed door de infectiedosis; de tuberculeuze infectie wordt het meest doeltreffend beheerst bij die caviae, die met een kleine dosis (aantal bacteriën 2×10^3) zijn besmet (PEIZER, 1957). De onderzoeken van BARTMANN (1957-IV, 1959), waarbij met een nog lagere dosis is geïnfecteerd stemmen hiermede volkomen overeen.

b. VIRULENTIE VAN DE TUBERKELBACTERIËN

Dit is een moeilijk te definiëren factor. Het is zeker, dat niet alle INH-gevoelige tuberkelbacteriën dezelfde virulentie hebben.

De door VELTMAN (1955) gebruikte laboratoriumstam H37Rv is voor een cavia virulenter dan een tuberkelbacteriecultuur geïsoleerd uit een huidlaesie van een patiënt, terwijl BARTMANN (1955) een verschil in virulentie vindt tussen twee laboratoriumstammen.

De onderzoeken van SINGH (1964) in New-Delhi tonen aan dat INH-sensibele Indiase tuberkelbacteriën, in vergelijking met tuberkelbacteriën uit de Verenigde Staten of Europa, een verminderde virulentie voor caviae bezitten. Deze verminderde virulentie was gebonden aan de tuberkelbacterie en berustte niet op een verminderde gevoeligheid van „Indiase” caviae voor het micro-organisme. Van een aantal Indiase culturen werd namelijk de virulentie in Duitsland eveneens nagegaan en daarbij bleek, dat deze Indiase culturen ook voor „Duitse” caviae verminderd virulent waren.

c. OPTREDEN VAN RESISTENTIE

Het falen van INH-therapie in dierproeven zou samen kunnen hangen met het optreden van INH-resistentie. Bij de onderzoeken van SCHMIDT (1956) met apen, FREERKSEN (1957) met konijnen en BARTMANN (1957-V) met caviae bleven de tuberkelbacteriën echter INH-sensibel, bij de muizenproeven van CANETTI (1960) trad bij behandeling met INH snel resistentie voor dit middel op.

d. BEGIN INH-THERAPIE

Het tijdstip, waarop met INH wordt begonnen zal zeker een rol spelen, immers de besmetting heeft meer gelegenheid gehad zich uit te breiden, wanneer de therapie later wordt ingesteld. PEIZER (1957) zag een duidelijk ongunstiger effect, wanneer veertien dagen na de infectie met INH wordt begonnen, dan wanneer gelijktijdig met de besmetting dit middel is gegeven. FUST en STUDER (1952) zagen hetzelfde bij de experimentele meningitis tuberculosa van het konijn.

e. DOSIS INH

Dat de dosis INH een rol speelt, wordt o.a. door CANETTI (1960) aangegeven. Bij intraveneuze infectie van muizen trad eerder en sneller een daling van het aantal tuberkelbacteriën in de long op met een orale INH-dosis van 1 mg d.d. dan met 0,1 mg INH.

FEREBEE en PALMER (1956) onderzochten eveneens de invloed van INH-dosering bij caviae; 5 mg INH per kg caviagewicht had een gunstiger effect dan een dosis van 1 mg/kg. Er bestond echter geen verschil tussen de groepen, die 5 of 25 mg INH/kg lichaamsgewicht aan het drinkwater kregen toegevoegd. Ook de frequentie waarmee

INH wordt gegeven bepaalt bij caviae mede het effect. Een bepaalde hoeveelheid INH heeft meer effect, wanneer het gegeven wordt in grotere, minder frequente doses, dan in kleinere, meer frequentere dosering (PALMER, 1956).

f. DUUR VAN DE THERAPIE

Ongunstige therapeutische resultaten zijn verkregen bij een kortdurende therapie, zoals blijkt uit de caviaproeven van SHER (1957) en BOJALIL (1958). Hierbij is INH gedurende twee maanden gegeven. In de eerste maanden na het staken der therapie kon geen tuberculose worden aangetoond, maar na 9 maanden stierf een groot percentage der dieren aan tuberculose of ontwikkelde zich weer een lymphklier-tuberculose in het gebied van de infectieplaats.

HUMBERT (1954) en GIERHAKE (1955) kwamen tot gunstiger resultaten, zij gaven INH echter langer dan een jaar.

g. OBSERVATIEDUUR

Wanneer de observatieperiode na het staken der therapie te kort is, kunnen verkeerde conclusies worden getrokken, zoals door SHER (1957) is aangetoond. In de eerste 6 maanden na het staken der therapie zijn bij de caviae geen macroscopische tuberculeuze afwijkingen gevonden, doch 9 maanden na het staken stierven de dieren aan tuberculose.

FREERKSEN (1957) vond bij konijnen, die 12 maanden INH hadden gehad recidieven 3 tot 4 jaar na het staken der therapie. Dit was een gevolg van onvoldoende „sterilisering” van het dier en niet van het resistent worden van de tuberkelbacterie.

h. KEUZE VAN HET PROEFDIER

Bij infectie is er strijd tussen het macro-organisme met zijn afweerkrachten en het micro-organisme met zijn aanvalskracht. Derhalve zal de keuze van het proefdier van invloed zijn om het resultaat van INH te beoordelen.

SCHMIDT (1956) bracht tuberculine negatieve, gezonde apen in contact met apen, die uitgebreide longtuberculose hadden. Alle dieren kregen INH oraal. Zolang voldoende INH werd gegeven bleef de tuberculinereactie van de „te besmetten” apen negatief, doch van de

27 tuberculine negatieve apen kregen 13 (= 48%) 4 tot 8 maanden na het staken der INH-toediening een positieve reactie en ontwikkelde zich tenslotte een progressieve tuberculose, waarbij de tuberkelbacteriën normaal gevoelig voor INH waren gebleven. De overige 14 dieren hielden een negatieve tuberculinereactie zelfs 10 tot 18 maanden na het staken der therapie.

Betere resultaten met INH zijn bij kalveren verkregen. Wanneer pasgeboren kalveren blootgesteld werden aan een aerogene besmetting door contact met een „open tuberculose” koe, of deze kalveren kregen tuberkelbacteriën bevattende melk te drinken, is een INH-toediening in staat de kalveren voor het aanslaan van een tuberculeuze besmetting te vrijwaren. De tuberculinereactie bleef negatief, ook na het staken van INH (SEELEMANN en BUSCHKIEL, 1957, 1958).

Bij beide proeven is met INH begonnen op het moment, dat de dieren aan de infectie werden blootgesteld. Bij apen vallen de proeven veel ongunstiger uit dan bij kalveren.

i. INH-INACTIVATOREN

Een andere factor die het therapeutisch effect van INH beïnvloedt is de hoogte van de concentratie in het serum. Deze concentratie hangt ten nauwste samen met de snelheid van afbraak van het medicijn. Bij de mens moet hiermede zeker rekening worden gehouden, daar er sterke individuele verschillen zijn (DE GRAAFF, 1965). Bij patiënten, die tot de zg. snelle afbrekers behoren, wordt INH door de lever zo snel afgebroken tot therapeutisch niet werkzame chemische stoffen, dat er een te lage concentratie van actief werkend INH in het bloed ontstaat. Op de genezing van het ziekteproces zal dit een vertragende uitwerking hebben (DE GRAAFF, 1965).

Bij de snelle afbrekers zal de dosis INH moeten worden aangepast bij deze snelle inactivering.

PAR. 3

TUBERCULINEREACTIE ONDER INVLOED VAN INH-BEHANDELING

PEIZER (1957) zag bij een aantal met INH-sensibele tuberkelbacteriën besmette caviae dat de tuberculinereactie weer negatief werd tijdens behandeling met INH. Hetzelfde is door GIERHAKE (1955) en GENTRY (1958) waargenomen. De laatste onderzoeker merkt bovendien op, dat ondanks een negatieve tuberculinereactie tuberkelbacte-

riën in enkele gevallen uit de caviaorganen konden worden gekweekt.

SEELEMANN en BUSCHKIEL (1957) vermeldde, dat bij kalveren de tuberculinereactie weer negatief werd tijdens behandeling met INH.

PAR. 4

INVLOED VAN INH OP EEN INFECTIE MET INH-RESISTENTE TUBERKELBACTERIËN

De vraag moet beantwoord worden of INH ook invloed heeft op een tuberculeuze infectie met INH-resistente bacteriën. Dit lijkt nogal eenvoudig, omdat men bij resistente bacteriën geen enkel effect verwacht.

BARNETT, BUSHBY en MITCHISON (1953) zagen echter bij muizen een ongunstige invloed van INH bij de behandeling van een infectie met INH-resistente bacteriën. De overlevingstijd van de met resistente bacteriën besmette muizen werd kleiner, wanneer 20 mg INH/kg in plaats van 4 mg/kg werd gegeven. Deze verkorting van de overlevingstijd was niet het gevolg van toxische eigenschappen van 20 mg INH/kg, daar de muizen welke besmet werden met INH-sensibele tuberkelbacteriën deze dosis goed verdroegen. De ongunstige invloed werd in deze proeven niet gezien bij caviae, doch MITCHISON (1954) zag later bij caviaproeven wel een ongunstige invloed van INH bij besmetting met resistente bacteriën.

Hoofdstuk III

EIGEN ONDERZOEK EN VERGELIJKING MET RESULTATEN UIT DE LITERATUUR

Zoals reeds in de inleiding is beschreven, was het de bedoeling het verloop van een tuberculeuze infectie bij caviae te vervolgen na besmetting met tuberkelbacteriën, die verschillen in virulentie en resistentie en de invloed van INH-toediening hierbij na te gaan. De proefopstelling wordt in tabel 2 schematisch weergegeven. Alle dieren van de proeven A - B werden op dezelfde datum geïnfecteerd. Ook de besmetting van de caviae van de proeven I - II - III - IV gebeurde op eenzelfde dag. Hetzelfde geldt voor de proeven 1 - 2 - 3.

A	B	I	II	III	IV	1	2	3
Lab.stam H37 Rv		Cultuur uit sputum				Cultuur uit sputum		
A sens. zonder INH	B sens. met INH	I sens. zonder INH	II sens. met INH	III res. zonder INH	IV res. met INH	1 sens. zonder INH	2 res. zonder INH	3 res. met INH

Tabel 2

Overzicht van de verschillende proeven.

De volgende zes punten golden voor elk van de proeven.

1. De dieren hadden voor de besmetting ongeveer hetzelfde gewicht en een negatieve Mantoux-reactie.

De Mantoux-reactie is gedaan met 0,1 ml 1% oud-tuberculine intracutaan. De aflezing gebeurde na 72 uur en werd als positief beschouwd bij roodheid en zwelling van tenminste 0,5 cm.

2. De besmetting gebeurde intramusculair in de rechter achterpoot met een infectiedosis 0,2 mg vochtig gewicht (= plm. 8×10^6 bacteriën). In vergelijking met de gegevens uit de literatuur is dit een hoge infectiedosis (bladz. 16). De bacteriën waren afkomstig van de cultuurbuizen, zodat gesproken moet worden van een secundaire virulentiebepaling.

3. Het tijdstip waarop de dieren werden onderzocht was voor alle

proeven gelijk en wel 2, 4, 6, 8, 10, 14, 20 en 26 weken na infectie. Deze data waren tevoren vastgesteld. Wanneer een dier stierf, werd het bij het dichtstbijzijnde tijdstip ingedeeld.

4. Delen van lever, milt, long en nier werden gekweekt en bij positieve kweekproef op hun gevoeligheid voor INH onderzocht, terwijl tevens de katalase-activiteit der bacteriën werd nagegaan. Zo mogelijk werd pus uit de infectieplaats en de regionale lieslymfklier cultureel op de aanwezigheid van bacteriën onderzocht. Bij de proeven A - B, I - II - III - IV werden bovengenoemde organen met hetzelfde instrumentarium verwijderd. Klier en infectieplaats werden het laatst gepakt, daar deze meestal pus bevatten. Wel werd natuurlijk voor elk dier een apart instrumentarium gebruikt. Bij de proeven 1 - 2 - 3 werd elk orgaan, klier en infectieplaats met een apart mes en pincet verwijderd, zodat een positieve orgaankweek ook uit dit orgaan afkomstig was.

Om de tuberkelbacteriën via de kweekmethode in een orgaan aan te tonen werd een stukje van dit orgaan in een zg. Griffith-buis verwreven met 1 à 2 ml isotonische zoutoplossing. Na bezinking van de grovere partikels werd de suspensie geënt op Löwenstein-Jensen voedingsbodems. Na 8 weken werd de kweekproef afgelezen (MULDER-DE JONG, 1960). De katalase-activiteit werd met de objectglas methode bepaald.

5. Andere delen van lever, milt, long en nier werden histologisch onderzocht aan de hand van haematoxyline-eosine, reticuline, Azan en Ziehl-Neelsen kleuring (ZN). Als controle van de Ziehl-Neelsen kleuring werd een ZN-positief orgaan meegekleurd, waarin de bacteriën duidelijk te zien waren om te voorkomen, dat een negatieve ZN zou berusten op een kleuringsfout. De patholoog-anatoom, die de coupes in eerste instantie zag, was niet op de hoogte waarmee de dieren waren geïnfecteerd en of ze al of niet met INH waren behandeld. Vervolgens werden de coupes opnieuw bekeken nadat ze waren gerangschikt naar de onder „3” genoemde tijdstippen van onderzoek en de proef waarbij ze behoorden.

6. De therapie met INH begon 4 weken na infectie. De dosis bedroeg 4 mg/kg lichaamsgewicht en werd 3 keer per week intramusculair in de linker achterpoot toegediend. Deze intermitterende INH-behandeling werd in navolging van BARTMANN en medewerkers gekozen (1955-I; 1956-II).

Proef A.

21 caviae met een gemiddeld gewicht van 440 gram werden geïnfecteerd met een INH-sensibele laboratoriumstam H37Rv. Deze cultuur, verkregen van het Rijks Instituut voor de Volksgezondheid, had een positieve katalase-activiteit, namelijk zuurstofontwikkeling na 4 seconden. Er was duidelijke groei op de controlebuis, terwijl bij een enting van 1 mg op de resistentiebuis de groei volledig werd onderdrukt door 0,1 mcg INH/ml.

Resultaten

a. Eén cavia stierf 9 weken na infectie. Van dit dier waren de organen macroscopisch en microscopisch normaal, alleen de kweek van de milt en de lieslymfklier waren positief. De andere 20 dieren werden op het vastgestelde tijdstip onderzocht.

b. Alle caviae vertoonden een gewichtsstijging, zelfs die, welke 26 weken na infectie werden onderzocht.

c. De Mantoux-reactie werd 6 weken na infectie weer verricht, deze bleek positief te zijn bij alle dieren en bleef positief in het verdere verloop.

d. Bij de caviae die na 4 weken werden onderzocht bestond een zwelling van de lymfklier in de lies en was er pus op de infectieplaats. Tuberkelbacteriën konden hieruit worden gekweekt. Deze afwijkingen bleven in het verdere verloop van de proef aanwezig.

e. Na 8 weken bleken macroscopische tuberculeuze afwijkingen te bestaan in de milt, na 20 weken eveneens in de lever en long. In de nier werden macroscopische afwijkingen niet gevonden. 9 van de 12 caviae, waarbij de infectie langer dan 8 weken had bestaan, toonden macroscopische afwijkingen in één of meer interne organen.

f. 6 weken na infectie waren histologische afwijkingen zichtbaar in de milt, na 20 weken ook in de lever en long. Histologische tuberculeuze afwijkingen werden in de nieren niet aangetroffen. Bij 8 van de 15 caviae, waarbij de infectie langer dan 6 weken had bestaan, werden histologische afwijkingen in één of meer interne organen gevonden.

g. Dit histologisch beeld werd beheerst door epitheloidceltuberkels met in sommige gevallen geringe verkazing, reuscellen werden niet gezien. In de tuberkels waren met de reticulinekleuring argentophiele vezels aanwezig.

h. Bestond de infectie 4 weken dan gelukte het tuberkelbacteriën uit de interne organen te kweken. Daar de organen met hetzelfde instrumentarium werden verwijderd, was het helaas niet aan te geven uit welk orgaan deze bacteriën afkomstig waren. De tuberkelbacteriën, die uit de organen gekweekt werden, waren gevoelig voor INH. (Groei op de controlebuis, volledige remming door 0,1 mcg/ml INH). De katalase-activiteit van deze orgaanculturen was normaal. Het kunnen terugkweken van de tuberkelbacteriën uit één of meer interne organen gelukte bij alle 18 dieren, waarbij de infectie 4 weken of langer had geduurd.

Hoewel er bij deze proef werd geïnfecteerd met een INH-sensibele stam bleek deze toch weinig virulent voor de cavia te zijn, daar de dieren weinig ziek werden en in gewicht bleven aankomen.

Een overzicht van proef A wordt gegeven in tabel 3.

Proef B.

32 caviae met een gemiddeld gewicht van 428 gram werden met dezelfde stam geïnfecteerd als bij proef A, doch werden met INH behandeld.

Resultaten

a. Spontane sterfte deed zich niet voor.

b. De dieren bleven in gewicht stijgen.

c. Na 6 weken hadden alle dieren een positieve of een zwak-positieve Mantoux-reactie. 13 weken na infectie kon deze reactie herhaald worden bij 12 caviae. Bij deze 12 dieren bestond na 2 weken INH-therapie nog een positieve reactie, echter na 9 weken therapie was de tuberculinereactie 5 keer negatief en 7 keer zwak-positief geworden. Bij 4 dieren, die 20 weken INH hadden gehad, bleek de Mantoux-reactie nog zeer zwak positief te zijn, terwijl deze dieren in de eerste fase van de therapie een duidelijk positieve reactie hadden. Dit gedrag van de tuberculinereactie gedurende INH-behandeling is in

overeenstemming met hetgeen door PEIZER, GIERHAKE en GENTRY is vermeld (bladz. 29).

d. De macroscopische afwijkingen beperkten zich tot de aanwezigheid van pus op de injectieplaats en zwelling van de lymphklier. De interne organen vertoonden macroscopisch een normaal beeld.

e. Histologische afwijkingen werden niet gezien.

f. De afwijkingen op de plaats van infectie en van de lymphklier waren nog aanwezig bij die caviae, die 4 weken INH hadden gehad. Uit deze laesies konden tuberkelbacteriën worden gekweekt. Deze bacteriën hadden hun normale gevoeligheid voor INH behouden en bleven katalase-positief.

g. Was de therapie 6 weken of langer gegeven, dan waren injectieplaats en lymphklier normaal en konden geen tuberkelbacteriën worden teruggekweekt.

h. Het gelukte niet tuberkelbacteriën uit de interne organen te kweken, wanneer de therapie langer dan 6 weken had geduurd, met uitzondering van één van de 16 dieren, waarbij bacteriën uit lever en long zijn gekweekt, nadat 16 weken INH was gegeven. Deze cultuur was normaal gevoelig voor INH; de Mantoux-reactie van dit dier was negatief. Het is dus mogelijk, dat een cavia tuberkelbacteriën in zich herbergt, terwijl de Mantoux-reactie negatief is. Ditzelfde is door GENTRY (1958) beschreven.

Een overzicht van proef B wordt gegeven in tabel 4.

CONCLUSIE PROEF A en B

Uit het verloop van de tuberculinereactie, de bevindingen op de injectieplaats en in de regionale lymphklier, macroscopie, microscopie en orgaanculturen bleek het gunstig effect van deze intermitterende INH-behandeling na infectie met de laboratoriumstam H37Rv. Zowel bij de behandelde als bij de onbehandelde groep hadden de teruggekweekte tuberkelbacteriën hun oorspronkelijke gevoeligheid voor INH behouden en bleven katalase-positief, zodat we aan moeten nemen, dat de afwijkingen veroorzaakt zijn door INH-sensibele bacteriën.

Periode	Aantal caviae	In één of meer organen				Positieve cultuur uit injectieplaats en/of lymphklier
		Macrosc. tbc.	Histol. tbc. ZN +	Histol. tbc. ZN —	Positieve cultuur	
1e	9	0	2 (22,2%)	0	6 (66,6%)	6 (66,6%)
2e	6	3 (50%)	2 (33,3%)	0	6 (100%)	6 (100%)
3e	6	6 (100%)	3 (50%)	1 (16,6%)	6 (100%)	6 (100%)

In alle kolommen wordt het aantal dieren met macroscopische, resp. histologische afwijkingen of positieve kweken vermeld.

Wordt in één der interne organen histologisch tuberculose gevonden met een positieve ZN kleuring van de coupe, dan worden van hetzelfde dier de andere organen met histologisch tuberculose en een negatieve ZN kleuring niet meegemeld.

1e periode 2e t/m 6e week, 2e periode t/m 10e week, 3e periode na 10e week.

Tabel 3.

Overzicht proef A: 21 caviae geïnfecteerd met INH-sensibele tuberkelbacteriën (laboratoriumstam H37Rv). Infectieduur in 3 perioden verdeeld.

Periode	Aantal caviae	In één of meer organen				Positieve cultuur uit injectieplaats en/of lymphklier
		Macrosc. tbc.	Histol. tbc. ZN +	Histol. tbc. ZN —	Positieve cultuur	
1e	8	0	0	0	2 (25%)	7 (87,5%)
2e	12	0	0	0	4 (33,3%)	6 (50%)
3e	12	0	0	0	0	0

Zie voor verklaring tabel 3.

Tabel 4.

Overzicht proef B: 32 caviae geïnfecteerd met INH-sensibele tuberkelbacteriën (laboratoriumstam H37Rv). Behandeling met INH, beginnend 4 weken na infectie. Infectieduur in 3 perioden verdeeld.

Uit proef A is gebleken, dat de laboratoriumstam H37Rv weinig virulent voor de cavia was. Uit eigen laboratoriumervaring was bekend, dat de meeste INH-sensibele culturen uit het sputum van een patiënt duidelijk virulent voor de caviae waren. Bij de proeven I - II - III - IV wordt geïnfecteerd met een INH-sensibele tuberkelbacteriëncultuur uit het sputum van een patiënt, omdat van deze cultuur te verwachten viel, dat ze meer virulent voor de cavia zou zijn dan de laboratoriumstam.

Proef I.

21 caviae met een gemiddeld gewicht van 547 gram werden met INH-sensibele tuberkelbacteriën, afkomstig uit het sputum van een niet met INH behandelde patiënt, geïnfecteerd. Van deze cultuur was de katalase-reactie positief (5 seconden) en de gevoeligheid voor INH bij een entdosis van 1 mg als volgt; controlebuis: groei ++ — 0,1 mcg INH 5 kolonies — 0,3 mcg INH geen groei (zie bladz. 3).

Resultaten

a. 7 caviae stierven tussen 6e en 14e week aan de tuberculeuze infectie. 14 weken na infectie waren alle dieren onderzocht.

b. 5 weken na infectie trad een gewichtsdeling op (gemiddeld 70 gram).

c. Ruim 7 weken na infectie bleek van de 10 onderzochte caviae de Mantoux-reactie 7 keer positief te zijn, 1 keer zwak-positief en 2 keer negatief, hoewel bij deze laatste dieren macroscopische en microscopische tuberculeuze afwijkingen bestonden.

d. Op de plaats van infectie en in de meestal vergrote lymphklier was bij de na 2 weken onderzochte dieren pus aanwezig, waaruit tuberkelbacteriën konden worden gekweekt. Deze bacteriën bleken INH-gevoelig en de katalase-reactie was positief.

e. 2 weken na infectie gelukte het tuberkelbacteriën uit de interne organen te kweken. Ook deze bacteriën bleken INH-gevoelig en katalasepositief.

f. 4 weken na infectie waren de eerste macroscopische tuberculeuze afwijkingen aanwezig in lever en milt, 5-6 weken na infectie ook in de longen. In de nier konden macroscopisch geen tuberculeuze afwijkingen worden gevonden.

g. De eerste microscopische afwijkingen werden na 2 weken gezien in de milt en na 4 weken ook in lever en long. Het microscopisch beeld van de nieren was steeds normaal.

Van de 19 histologisch positieve levers werden in 16 gevallen tuberculeuze afwijkingen met positieve Ziehl-Neelsen kleuring van de coupe gevonden, 3 keer was deze kleuring negatief. Voor de 18 histologisch positieve milten zijn deze getallen 17, resp. 1 en voor de 18 histologisch positieve longen 16 en 2 (tabel 5).

	Aantal organen	Histologisch tuberculeuze afwijkingen		
		totaal	ZN +	ZN —
Lever	21	19	16	3
Milt	19*	18	17	1
Long	21	18	16	2

Tabel 5.

De aanwezigheid van kleurbare tuberkelbacteriën in de coupe bij histologische tuberculeuze afwijkingen in lever, milt en long (proef I).

*) 2 milten gingen verloren voor microscopisch onderzoek.

In de preparaten overheersten de epitheloidceltuberkels al of niet met necrose, het duidelijkst is deze tuberkelvorming in de lever. In de milt werden soms exsudatief-necrotische partijen gezien zonder duidelijke tuberkelvorming. Vooral in de tuberkels in de lever bleef een structuur van argentophiele vezels aanwezig. Azan positieve vezels, als teken van de aanwezigheid van bindweefselvezels, werden in de tuberkels niet gezien, evenmin als in de omgeving. Sporadisch werd een reuscel aangetroffen.

De bevindingen van proef I zijn in tabel 6 weergegeven, waarbij de infectie in drie perioden is verdeeld. Uit tabel 6 blijkt een totaal van 18 microscopische positieve organen met positieve ZN, uit tabel 5 echter een maximum van 17. Dit verschil wordt verklaard doordat één milt voor de microscopie verloren ging, waarvan de bijbehorende lever microscopische afwijkingen met positieve ZN vertoonde.

Wordt deze proef I vergeleken met proef A (H37Rv) dan blijkt, dat deze laboratoriumstam minder virulent voor de cavia was dan de cultuur uit het sputum. De sputumcultuur gaf meer sterfte, daling van het gewicht, uitgebreidere afwijkingen en eerder optreden van macroscopische en microscopische afwijkingen. Deze verminderde virulentie kwam vooral tot uiting in de beginfase van de infectie: terwijl de laboratoriumstam een langzaam progressief verloop gaf, werden bij de besmetting met de sputumcultuur reeds in het begin uitgebreide macroscopische tuberculeuze afwijkingen gevonden (zie tabel 7).

In het histologisch beeld van de tuberculose bestonden geen verschillen.

Periode	Aantal caviae	In één of meer organen				Positieve cultuur uit injectieplaats en/of lymphklier
		Macrosc. tbc.	Histol. tbc. ZN +	Histol. tbc. ZN —	Positieve cultuur	
1e	11	8 (72,7%)	8 (72,7%)	2 (18,2%)	11 (100%)	11 (100%)
2e	9	9 (100%)	9 (100%)	0	9 (100%)	9 (100%)
3e	1*	1	1	0	1	1

Zie voor verklaring tabel 3.

*) *Cavia* stierf 14 weken na infectie.

Tabel 6.

Overzicht proef I: 21 caviae geïnfecteerd met INH-sensibele tuberkelbacteriën afkomstig uit het sputum van een patiënt. Infectieduur in 3 perioden verdeeld.

Periode	Proef	Aantal caviae	Macroscopie *)	Histologie ZN + en ZN — *)	Positieve orgaankweek *)
1e	A I	9	0	2 (22,2%)	6 (66,6%)
2e t/m 6e week		11	8 (72,7%)	10 (90,9%)	11 (100%)
2e	A I	6	3 (50%)	2 (33,3%)	6 (100%)
t/m 10e week		9	9 (100%)	9 (100%)	9 (100%)
3e	A I	6	6 (100%)	4 (66,6%)	6 (100%)
na 10e week		1	1	1	1

*) In de kolommen is het aantal caviae vermeld met minstens in één orgaan macroscopische resp. histologische tuberculeuze afwijkingen of met een positieve kweek uit minstens één orgaan.

De onderzochte organen zijn lever, milt en long.

Tabel 7.

Vergelijking van de macroscopie, histologie en orgaanculturen van twee proeven, waarbij caviae zijn geïnfecteerd met INH-sensibele tuberkelbacteriën. Bij proef A is besmet met laboratoriumstam H37Rv, bij proef I met cultuur uit sputum van een patiënt. Infectieduur in 3 perioden verdeeld.

BARTMANN (1957-I) heeft erop gewezen, dat de laboratoriumstam H37Rv eigenlijk een niet sterk virulente stam is. Onze proeven kwamen dus overeen met de bevindingen van BARTMANN.

Proef II.

32 caviae met een gemiddeld gewicht van 554 gram werden met dezelfde cultuur geïnfecteerd als bij I, doch nu werden de dieren met INH behandeld.

Resultaten

a. Tijdens de proef stierven 7 dieren, waarvan 3 aan een pneumonie (Uit de long konden pneumococci worden gekweekt). 3 andere caviae stierven 4-5½ week na de infectie, ze hadden toen dus hoogstens 1½ week INH gehad. Bij deze dieren werden macroscopische tuberculeuze afwijkingen in de interne organen gevonden. De zevende cavia stierf 8½ week na de besmetting, hierbij werden macroscopische tuberculeuze haarden in de milt gezien. Van de groep van 3 caviae, die 26 weken zouden worden vervolgd waren allen nog in leven.

b. Aanvankelijk trad een daling van het gewicht op, doch in de loop van de behandeling met INH werd deze gevolgd door een gewichtsstijging. Deze stijging begon ongeveer na 2 weken INH-therapie.

c. Ruim 7 weken na infectie was de Mantoux-reactie positief, doch bij 2 van de 3 caviae, die 22 weken INH hadden gehad, bleek de Mantoux-reactie weer negatief te zijn geworden. Bij één van de 2 dieren met een negatief geworden Mantoux-reactie was de kweek uit de milt positief en konden tuberkelbacteriën uit de regionale lymphklier worden gekweekt (zie ook bladz. 34).

d. Bij de dieren, die 1½ tot 22 weken INH hadden gehad, was pus op de plaats van infectie en/of een vergrote lymphklier met pus aanwezig. Hieruit konden tuberkelbacteriën worden gekweekt met uitzondering van 2 van de 3 dieren, die 22 weken waren behandeld. De teruggekweekte tuberkelbacteriën waren gevoelig voor INH (groei volledig geremd door 0,1 mcg INH/ml) en hadden een normale katalase-activiteit. Uitzondering vormden twee dieren, die 12½-13 weken waren behandeld. De bacteriën uit deze proefdieren groeiden op de resistentiebuis, waaraan 1 mcg INH/ml was toegevoegd en hadden een verminderde katalase-activiteit.

e. Gedurende de gehele proefperiode konden tuberkelbacteriën uit één of meer interne organen worden gekweekt, zelfs bij 2 van de 3 dieren die 22 weken waren behandeld was de cultuur van de milt

positief. De teruggekweekte bacteriën waren normaal gevoelig voor INH en katalase positief. Het kunnen terugkweken van INH-gevoelige bacteriën uit de cavia-organen na langere INH-behandeling komt overeen met de onderzoeken van BARTMANN (1957-V).

f. Na 6 weken INH-toediening waren in de lever, milt en long macroscopisch geen afwijkingen meer aanwezig. De nieren toonden gedurende het gehele onderzoek een normaal beeld.

g. De eerste histologische afwijkingen traden 4 weken na infectie op; vrijwel gelijktijdig in lever, milt en long. Wanneer INH langer dan 13 weken werd gegeven zagen we histologisch een normaal beeld in de lever, milt en long, wel gelukte het tuberkelbacteriën uit deze organen te kweken (zie e). Het microscopisch beeld van de nieren was steeds normaal.

Van de 24 histologisch positieve levers werden in 12 gevallen tuberculeuze veranderingen met positieve Ziehl-Neelsen kleuring van de coupe gevonden, in de overige 12 was deze kleuring negatief. Bij de milt waren deze getallen: 19 histologisch positief, waarvan 15 een positieve en 4 een negatieve ZN-kleuring vertoonden. Bij 9 histologisch positieve longen werd 6 keer een positieve en 3 keer een negatieve ZN-kleuring gevonden (tabel 8).

	Aantal organen	Histologische tuberculeuze afwijkingen		
		totaal	ZN +	ZN —
Lever	32	24	12	12
Milt	31	19	15	4
Long	32	9	6	3

Tabel 8.

De aanwezigheid van kleurbare tuberkelbacteriën in de coupe bij histologische tuberculeuze afwijkingen in lever, milt en long (proef II).

Het histologisch beeld van de tuberculeuze afwijkingen bestaat uit epitheloidceltuberkels al of niet met verkazing, reuscellen van Langhans werden zeer weinig gezien. Bindweefselvermeerdering in of rond de tuberkels werd niet waargenomen. Ook de coupes met reticulinekleuring toonden hetzelfde beeld als bij proef I.

De bevindingen van proef II zijn in tabel 9 weergegeven, de infectie is weer in drie perioden verdeeld.

Periode	Aantal caviae	In één of meer organen				Positieve cultuur uit injectieplaats en/of lymphklier
		Macrosc. tbc.	Histol. tbc. ZN +	Histol. tbc. ZN —	Positieve cultuur	
1e	11	8 (72,7%)	10 (90,9%)	0	11 (100%)	11 (100%)
2e	11	5 (45,4%)	5 (45,4%)	5 (45,4%)	11 (100%)	11 (100%)
3e	10	0	0	4 (40%)	8 (80%)	7 (70%)

Zie voor verklaring tabel 3.

Tabel 9.

Overzicht proef II: 32 caviae geïnfecteerd met INH-sensibele tuberkelbacteriën afkomstig uit het sputum van een patiënt. Behandeling met INH, beginnend 4 weken na infectie. Infectieduur in 3 perioden verdeeld.

DISCUSSIE PROEF I EN PROEF II

Wanneer caviae worden geïnfecteerd met een INH-gevoelige stam tuberkelbacteriën uit het sputum van een patiënt en 4 weken na infectie met het geven van INH wordt begonnen, blijkt een intermitterende dosering een therapeutische werking te hebben. Na 6 weken INH-therapie zijn lever, milt en long bij macroscopisch onderzoek weer normaal geworden, microscopisch blijkt genezing te zijn ontstaan na 13 weken INH-therapie. Waarschijnlijk is er sprake van „restitutio ad integrum”, daar histologisch geen resten van het tuberculeus proces worden gevonden. Verder blijkt bij de behandelde dieren na een voorafgaande daling weer een stijging van het gewicht op te treden. De overlevingstijd is bij de behandelde groep verlengd. De tuberculine-reactie wordt in enkele gevallen na langdurig INH-gebruik weer negatief, ondanks nog positieve miltkweeken.

Gezien het kweken van niet voor INH resistent geworden tuberkelbacteriën uit injectieplaats, lymphklier en uit de macroscopisch en microscopisch normale interne organen is het bij deze proeven, zelfs na 13-22 weken INH-therapie, niet volledig gelukt de tuberkelbacteriën bij de caviae te doden. Het is waarschijnlijk, dat deze bacteriën na het staken van de therapie tot een recidief aanleiding zouden hebben gegeven.

DISCUSSIE PROEF B EN PROEF II.

Wanneer men de proef met de laboratoriumstam H37Rv (B) met proef II, waarbij geïnfecteerd werd met bacteriën uit het sputum

vergelijkt, is het therapeutisch effect van INH het duidelijkst bij de infectie met de minder virulente laboratoriumstam. De invloed van INH was het duidelijkst zichtbaar aan de kweekbaarheid van de tuberkelbacteriën in de derde periode. Bij de infectie met de sputum-cultuur is het therapeutisch effect van INH wel aanwezig, doch minder sterk dan bij de laboratoriumstam. Op bladzijde 38 werd reeds gewezen op het verschil in virulentie van beide culturen. INH vertoont vooral een bijzonder gunstige werking bij een infectie teweeggebracht door de weinig virulente stam.

Het komt ons daarom voor, dat bij caviaproeven betreffende INH-prophylaxe rekening gehouden moet worden met de virulentie van de tuberkelbacteriën, waarmee het proefdier wordt geïnfecteerd. Zo schrijft BARTMANN (1957-III) de goede resultaten, die FEREBEE en PALMER (1956) bij hun caviaproeven over INH-prophylaxe zien, toe aan de geringe virulentie van de door hen gebruikte laboratoriumstam H37Rv. Onze proeven geven steun aan de conclusies van BARTMANN. Minder goede resultaten van de INH-prophylaxe zag BARTMANN, wanneer hij zijn caviae infecteerde met een virulente laboratoriumstam Washington I.

Proef III.

42 caviae met een gemiddeld gewicht van 525 gram werden geïnfecteerd met INH-resistente tuberkelbacteriën afkomstig uit het sputum van een patiënt. Deze cultuur had een verminderde katalase-activiteit (zuurstofontwikkeling na 30 seconden) en op de resistentiebuis was duidelijke groei, wanneer aan de voedingsbodem 30 mcg INH/ml was toegevoegd. Teneinde een zo hoog mogelijke graad van homogene resistentie te verkrijgen werd de cultuur, in navolging van BARNETT bladz. 14), 3 x overgeënt op een 30 mcg INH/ml bevattende bodem.

Resultaten

a. Tijdens de proef stierven 15 dieren, waarvan 14 aan een pneumonie (Uit de longen konden pneumococci worden gekweekt). Het andere dier stierf 4½ week na infectie, waarschijnlijk aan tuberculose, daar in de milt macroscopische tuberculeuze afwijkingen voorkwamen. Bij proef I (infectie met INH-sensibele bacteriën) overleefden de caviae de tuberculeuze infectie niet langer dan 14 weken. Bij deze

proef II met resistente bacteriën waren 14 weken na infectie nog 10 caviae in leven, 3 dieren overleefden de infectie 26 weken.

b. De eerste 8 weken werd veel hinder ondervonden van een pneumococceninfectie. Uit het gewichtsverloop in die periode zijn daarom geen duidelijke gevolgtrekkingen te maken. Bij de groepen dieren, die 10, 14, 20 en 26 weken na infectie werden onderzocht, was een stijging van het gewicht opgetreden, die varieerde van 100-200 gram.

c. De Mantoux-reactie bleek 7 weken na infectie positief te zijn geworden en bleef dit gedurende de observatieperiode.

d. 2 weken na infectie bleek pus op de plaats van inspuiting aanwezig te zijn, meestal gepaard gaande met vergroting en abscedering van de lymphklier. Bij 1 van de 3 dieren, die na 26 weken werd onderzocht, werd pus gevonden op de injectieplaats, waaruit tuberkelbacteriën konden worden gekweekt. Gedurende de observatieperiode van 2-26 weken was het mogelijk bij 24 van de 42 caviae tuberkelbacteriën uit de injectieplaats en/of lymphklier te kweken. In alle gevallen hadden de teruggekweekte bacteriën hun resistentie voor 30 mcg INH behouden en bleven een verminderde katalase-activiteit vertonen.

e. In de periode liggende tussen 2 en 14 weken na besmetting konden steeds bij één of meer dieren van de groepen, die op de daartussen gelegen tijdstippen werden onderzocht, uit één of meer interne organen tuberkelbacteriën worden gekweekt. In de late fase van de infectie en wel in de 20ste en 26ste week gelukte het slechts in 1 geval tuberkelbacteriën uit de milt te kweken op een totaal van 6 dieren. De uit de organen teruggekweekte bacteriën bleven INH-resistent en verminderd katalase-actief.

f. Macroscopische afwijkingen in de lever werden één keer gezien op een totaal van 42 caviae en wel bij het dier, dat 10 weken na infectie werd onderzocht. In de long werden tuberculeuze afwijkingen niet gevonden. 34 van de 42 milten werden macroscopisch normaal bevonden, de 8 positieve kwamen uit de periode 3-10 weken na infectie. De nieren waren macroscopisch steeds normaal.

g. De eerste histologische afwijkingen traden op 2 weken na infectie in lever en milt. Van de 15 histologisch positieve levers was in 6 gevallen tevens de Ziehl-Neelsen kleuring positief, 9 keer was deze negatief. Deze histologisch positieve levers werden gevonden tot en met 14 weken na infectie. Bij de 6 dieren, die 20 en 26 weken na infectie werden onderzocht, was het histologisch beeld van de levers normaal. Bij de 22 histologisch positieve milten werd 14 keer een positieve en 8 keer een negatieve ZN-kleuring geconstateerd. Bij de caviae, die 20 en 26 weken na infectie werden onderzocht, waren de milten normaal. In de long werd één keer histologisch tuberculose met een positieve tuberkelbacteriën kleuring gevonden en wel 3 weken na infectie. De nieren waren normaal ook bij histologisch onderzoek. Bovengenoemde gegevens zijn in tabel 10 verwerkt.

	Aantal organen	Histologische tuberculeuze afwijkingen		
		totaal	ZN +	ZN —
Lever	42	15	6	9
Milt	42	22	14	8
Long	42	1	1	

Tabel 10.

De aanwezigheid van kleurbare tuberkelbacteriën in de coupe bij histologische tuberculeuze afwijkingen in lever, milt en long (proef III).

Het histologisch beeld toonde epitheloidceltuberkels, al of niet met centrale verkazing, in lever, milt en long. Bij proef I werden in de milt exsudatief necrotische gebieden zonder duidelijke tuberkelvorming gezien, bij proef III werden deze niet waargenomen. Langhanse reus-cellen werden evenals bij de vorige proeven sporadisch aangetroffen. Het histologisch beeld was identiek met dat van de vorige proeven, dit gold voor alle toegepaste kleurmethoden. Behalve de tuberkels werden in ons materiaal geen andere structuren, met name niet de door KRACHT en PLIQUETT beschreven Retothelknötchen, gevonden. Bindweefselvermeerdering, waardoor afkapseling en hyalinisering der tuberkels, zoals door VINK wordt beschreven, werd door ons niet waargenomen (bladz. 19).

De bevindingen van proef III zijn in tabel 11 weergegeven. De infectieduur is weer in drie perioden verdeeld.

Periode	Aantal caviae	In één of meer organen				Positieve cultuur uit injectieplaats en/of lymphklier
		Macrosc. tbc.	Histol. tbc. ZN +	Histol. tbc. ZN —	Positieve cultuur	
1e	22	5 (22,7%)	11 (50%)	3 (13,5%)	20 (90,9%)	16 (72,7%)
2e	10	3 (30%)	3 (30%)	5 (50%)	7 (70%)	6 (60%)
3e	10	0	1 (10%)	3 (30%)	4 (40%)	2 (20%)

Zie voor verklaring tabel 3.

Tabel 11.

Overzicht proef III: 42 caviae geïnfecteerd met INH-resistente tuberkelbacteriën afkomstig uit het sputum van een patiënt. Infectieduur in drie perioden verdeeld.

VERGELIJKING PROEF I MET PROEF III.

Vergelijken we de proeven, waarbij caviae werden geïnfecteerd met een voor INH-sensibele cultuur tuberkelbacteriën (I) met die, waarbij caviae werden besmet met INH-resistente bacteriën (III), beide culturen afkomstig uit het sputum van patiënten, dan blijkt hieruit, dat de resistente stam voor caviae verminderd virulent was, van avirulentie was echter geen sprake.

Overlevingstijd:

De caviae die waren besmet met INH-resistente bacteriën konden 26 weken worden vervolgd en die welke waren geïnfecteerd met sensibele bacteriën slechts 14 weken, deze laatste dieren stierven aan de tuberculeuze infectie.

Gewicht:

Bij de besmetting met resistente bacteriën steeg het gewicht van de dieren, bij de met sensibele bacteriën geïnfecteerde daalde het lichaamsgewicht.

De bevindingen van overlevingstijd en gewicht komen overeen met hetgeen hierover in de literatuur is vermeld (bladz. 9).

Mantoux-reactie:

De Mantoux-reactie is bij beide soorten infecties positief 6-7 weken na de infectie. (Of deze eerder positief is geworden is bij onze proeven niet nagegaan). De resistente tuberkelbacteriën gaven dus eerder een positieve tuberculinereactie dan door PEIZER is aangegeven (bladz. 9).

Macroscopie:

De macroscopische bevindingen van beide soorten infecties zijn samengevat in tabel 12.

Proef	2e t/m 6e week		Na 6e week	
	Aantal caviae	Macr. afw.	Aantal caviae	Macr. afw.
I	11	8	10	10
III	22	5	20	3

Tabel 12.

Macroscopische tuberculeuze afwijkingen in lever, milt of long na besmetting met INH-sensibele (proef I) of INH-resistente tuberkelbacteriën (proef III). Infectieduur in twee perioden verdeeld.

In de tabellen 12 t/m 15 zijn de tweede en derde periode (tabel 6 en 11) samengevoegd, daar bij proef I slechts één cavia in de derde periode overbleef.

Uit tabel 12 blijkt, dat het aantal organen met macroscopische afwijkingen na infectie met INH-resistente bacteriën kleiner is dan na besmetting met INH-sensibele tuberkelbacteriën. Het verschil is significant zowel in de eerste 6 weken ($p < 0,01$) als na de 6e week ($p < 0,001$). De macroscopische bevindingen stemmen overeen met hetgeen hierover in de literatuur is vermeld (bladz. 10).

Bij de statistische berekeningen in dit onderzoek is gebruik gemaakt van de toets van FISHER voor 2×2 tabellen. Bij de berekening is zo mogelijk de χ^2 -benadering toegepast. In het geval dat het totaal aantal dieren van beide groepen minder is dan 20 of de kleinste verwachte frequentie is kleiner dan 5 zijn de exacte kansen berekend. Daar in de literatuur niet wordt vermeld dat INH-resistente bacteriën meer virulent voor de caviae zijn dan INH-sensibele wordt ons de mogelijkheid gegeven bij vergelijking van infecties door beide soorten bacteriën éénzijdig te toetsen. Derhalve worden bij vergelijking van een proef met resistente bacteriën met die met sensibele bacteriën éénzijdige significantieniveaus opgegeven. Als significant wordt dan beschouwd wanneer $p \leq 0,025$.

Om de resultaten, die in het verloop van een infectie met sensibele, resp. resistente bacteriën zijn verkregen statistisch te bewerken wordt tweezijdig getoetst, hierbij zijn tweezijdige overschrijdingskansen vermeld. Als significant bij de tweezijdige toetsing wordt beschouwd wanneer $p \leq 0,05$.

Histologie:

De uitkomsten van het histologisch onderzoek zijn vermeld in tabel 13. Tuberculeuze afwijkingen zowel met positieve ZN als met negatieve ZN-kleuring van het preparaat worden als histologisch positief beschouwd.

Proef	2e t/m 6e week		Na 6e week	
	Aantal caviae	Histol. afw.	Aantal caviae	Histol. afw.
I	11	10	10	10
III	22	14	20	12

Tabel 13.

Histologische tuberculeuze afwijkingen in lever, milt of long na besmetting met INH-sensibele (proef I) of INH-resistente tuberkelbacteriën (proef III). Infectieduur in twee perioden verdeeld.

Uit tabel 13 zien we dat in de eerste 6 weken geen significant verschil bestaat in het optreden van microscopische afwijkingen ($p = 0,10$). In de tweede periode worden deze afwijkingen na infectie met resistente bacteriën minder frequent aangetroffen, het verschil is statistisch significant ($p < 0,025$).

Orgaanculturen:

Tabel 14 geeft een overzicht van de kweekbaarheid van de tuberkelbacteriën uit de organen.

Proef	2e t/m 6e week		Na 6e week	
	Aantal caviae	Aantal caviae met op zijn minst één positieve orgaancultuur	Aantal caviae	Aantal caviae met op zijn minst één positieve orgaancultuur
I	11	11 = 100%	10	10 = 100%
III	22	20 = 90%	20	11 = 55%

Tabel 14.

Positieve orgaanculturen van lever, milt of long na besmetting met INH-sensibele (proef I) of INH-resistente tuberkelbacteriën (proef III). Infectieduur in twee perioden verdeeld.

Uit tabel 14 volgt, dat in de eerste 6 weken van de infectie tuberkelbacteriën, zowel sensibele als resistente, in een hoog percentage uit de organen teruggekweekt kunnen worden. In deze eerste fase is er geen significant verschil in het aantal positieve orgaanculturen.

In de latere fase van de infectie daarentegen is er duidelijk verschil in de kweekbaarheid van de tuberkelbacteriën uit de organen. Na de 6e week waren bij de infectie met de INH-resistente cultuur de positieve orgaankweken significant lager dan die na de besmetting met INH-sensibele bacteriën ($p < 0,025$).

Uit tabel 14 blijkt verder, dat de kweekbaarheid van resistente tuberkelbacteriën in het verloop van de infectie afneemt. Het aantal positieve orgaankweken, die na de 6e week worden gevonden verschilt statistisch significant van dat in de eerste 6 weken ($p = 0,02$).

Onze bevindingen van de orgaankweken zijn vrijwel gelijk aan de waarnemingen van MEISSNER (bladz. 12).

Ziehl-Neelsen kleuring:

De tuberkelbacteriën in de organen konden behalve met de kweekmethode ook met de ZN-kleuring worden aangetoond. Tabel 15 geeft hiervan een overzicht.

Na de 6e week is er een duidelijk verschil in de aanwezigheid van kleurbare bacteriën tussen proef I en III ($p < 0,001$). In het verloop van de infectie met resistente bacteriën is er, na de 6e week, wel een afname van de kleurbare tuberkelbacteriën in de organen, doch deze is niet statistisch significant ($p = 0,09$).

Proef	2e t/m 6e week		Na 6e week	
	Aantal caviae	Aantal caviae met op zijn minst in één orgaan + ZN-kleuring	Aantal caviae	Aantal caviae met op zijn minst in één orgaan + ZN-kleuring
I	11	8 = 72%	10	10 = 100%
III	22	11 = 50%	20	4 = 20%

Tabel 15.

Kleurbare tuberkelbacteriën in lever, milt of long na besmetting met INH-sensibele (proef I) of INH-resistente tuberkelbacteriën (proef III). Infectieduur in twee perioden verdeeld.

DISCUSSIE PROEF I EN PROEF III.

Uit overlevingstijd, gewichtsverloop, macroscopie en histologie blijkt dat hoog INH-resistente tuberkelbacteriën minder virulent voor de cavia zijn dan INH-sensibele bacteriën.

De migratie van tuberkelbacteriën vanuit de infectieplaats door de cavia was bij beide soorten bacteriën, voor zover uit onze proefopstelling was na te gaan, even snel. Twee weken na besmetting wer-

den microscopische afwijkingen met kleurbare tuberkelbacteriën in lever en milt gevonden, zowel bij de sensibele als de resistente bacteriën. Voor een „verminderd invasief vermogen” van de INH-resistente bacteriën, zoals door MEISSNER (bladz. 13) wordt aangenomen, leverden onze proeven geen aanknopingspunten.

De histologische tuberculeuze afwijkingen, die beide culturen in de interne organen gaven, waren identiek. Zowel de resistente als de sensibele tuberkelbacteriën gaven aanleiding tot vorming van epitheloidceltuberkels, waarvan sommige met verkazing. Reuscellen werden sporadisch aangetroffen. Wel werden bij de sensibele groep exsudatief necrotische gebieden in de milt gevonden, deze werden bij de resistente bacteriën niet gezien. Met de kleuring volgens Azan (bindweefsel) en reticuline (argyrophiele vezels) werden geen verschillen waargenomen.

De uit de caviae teruggekweekte tuberkelbacteriën waren bij proef I gevoelig gebleven voor INH en hadden hun katalase-activiteit behouden; de uit de caviae gekweekte bacteriën bij proef III waren INH-resistent en hadden een verminderde katalase-activiteit. We mogen dus aannemen, dat de macroscopische en histologische afwijkingen bij proef I door INH-gevoelige en bij proef III door INH-resistente tuberkelbacteriën zijn veroorzaakt.

De positieve orgaanculturen na infectie met INH-resistente tuberkelbacteriën nemen in het verloop van de infectie duidelijk af, terwijl na besmetting met INH-sensibele bacteriën het percentage positieve orgaankweken hoog blijft (tabel 14). De resistente bacteriën gaan blijkbaar in de cavia gemakkelijker ten gronde dan de sensibele.

Ook het onderzoek van de orgaanculturen pleit voor een verminderde virulentie van INH-resistente bacteriën.

Bij proef III werd na de 10e week een teruggang van de macroscopische orgaanafwijkingen waargenomen, na de 14e week trad eveneens regressie van de microscopische afwijkingen op (bladz. 44 f en g).

Het is aannemelijk, dat de regressie van de macroscopische en histologische afwijkingen in het verloop van een infectie met resistente tuberkelbacteriën samenhangt met het afsterven van de resistente bacteriën in de organen van de cavia.

Proef IV.

36 caviae met een gemiddeld gewicht van 468 gram werden geïnfecteerd met dezelfde, voor 30 mcg INH-resistente, cultuur als bij proef III, doch nu werden de dieren met INH behandeld.

Resultaten

a. In de eerste 10 weken stierven 16 dieren aan een pneumococcenpneumonie. 6 caviae werden na 6 weken, 1 na 8 weken, 4 na 10 weken, 4 na 14 weken, 4 na 20 weken en 1 cavia werd na 26 weken onderzocht.

b. In de periode met pneumococceninfectie waren uit het gewichtsverloop geen duidelijke gevolgtrekkingen te maken. Bij de dieren, die op de gestelde tijd van 10, 14, 20 en 26 weken na infectie werden onderzocht, trad een gewichtsstijging op, variërend van 115 tot 345 gram.

c. De Mantoux-reactie bleek 7 weken na infectie positief te zijn geworden en bleef dit gedurende de observatieperiode.

d. 3 weken na infectie was pus op de infectieplaats aanwezig, meestal gecombineerd met vergroting van de lymphklier. In elk verder stadium van de infectie bestond hetzelfde bij één of meer dieren van een groep, die op het vastgestelde tijdstip werden onderzocht. Uit de injectieplaats of uit de lymphklier konden op elk stadium na de derde week meestal tuberkelbacteriën worden gekweekt, behalve na 26 weken. Het resistentiepatroon van de teruggekweekte bacteriën was gelijk gebleven, ook was de katalase-activiteit onveranderd.

e. In de perioden liggend tussen 2 en 14 weken na de infectie was het mogelijk bij één of meer dieren van een groep, die op de daartussen gelegen tijdstippen werden onderzocht, tuberkelbacteriën uit één of meer interne organen te kweken. In de 20ste en 26ste week gelukte dit niet. Deze bacteriën hadden hun oorspronkelijke resistentiepatroon behouden en hadden nog een verminderde katalase-reactie.

f. Macroscopische tuberculeuze afwijkingen werden slechts in 2 milten gezien en wel na 10 weken. Lever, long en nieren bleven macroscopisch normaal.

g. 2-3 weken na de infectie zagen we in de milt de eerste histologische afwijkingen, in de lever na \pm 4-5 weken. Van de 15 histologisch positieve levers was in 3 gevallen tevens de Ziehl-Neelsen kleuring positief, 12 keer was deze kleuring negatief. Deze histologisch positieve levers werden gevonden tot en met 14 weken na infectie. Bij de 5 dieren, die na 20-26 weken werden onderzocht, waren de levers histologisch normaal. Bij de 17 histologisch positieve milten waren er in 7 gevallen tuberculeuze afwijkingen met positieve ZN-kleuring, bij de

overige 11 was deze kleuring negatief. Deze miltafwijkingen werden gevonden in de eerste 14 weken van de infectie. Bij de 5 caviae, die na 20-26 weken werden onderzocht waren de milten normaal. Histologische tuberculeuze afwijkingen en wel zonder kleurbare tuberkelbacteriën kwamen slechts in één long voor, dit 10 weken na infectie. De nieren vertoonden bij microscopisch onderzoek geen tuberculeuze afwijkingen.

Bovenstaande gegevens zijn in tabel 16 weergegeven.

	Aantal organen	Histologische tuberculeuze afwijkingen		
		totaal	ZN +	ZN —
Lever	36	15	3	12
Milt	36	17	7	10
Long	36	1		1

Tabel 16.

De aanwezigheid van kleurbare tuberkelbacteriën in de coupe bij histologische tuberculeuze afwijkingen in lever, milt en long (proef IV).

Het histologisch beeld was volkomen identiek met hetgeen bij proef III werd gevonden.

Tabel 17 geeft een overzicht van de uitkomsten van proef IV. De infectieduur is in drie perioden verdeeld.

Periode	Aantal caviae	In één of meer organen				Positieve cultuur uit injectieplaats en/of lymphklier
		Macrosc. tbc.	Histol. tbc. ZN +	Histol. tbc. ZN —	Positieve cultuur	
1e	17	0	6 (35,2%)	1 (5,8%)	13 (76,4%)	9 (52,9%)
2e	10	2 (20%)	2 (20%)	4 (40%)	8 (80%)	8 (80%)
3e	9	0	0	4 (44,4%)	2 (22,2%)	4 (44,4%)

Zie voor verklaring tabel 3.

Tabel 17.

Overzicht proef IV: 36 caviae geïnfecteerd met INH-resistente tuberkelbacteriën afkomstig uit het sputum van een patiënt. Behandeling met INH, beginnend 4 weken na infectie. Infectieduur in drie perioden verdeeld.

VERGELIJKING PROEF III MET PROEF IV.

Van de dieren, die 10, 14, 20 en 26 weken na infectie met resistente bacteriën werden onderzocht, vertoonden zowel de behandelde als onbehandelde een gewichtsstijging (tabel 18).

Weken na infectie	Gemiddelde stijging proef III	Gemiddelde stijging proef IV
10	115 gram	100 gram
14	125 „	137 „
20	267 „	200 „
26	345 „	200 „

Tabel 18.

Gewichtsverloop bij caviae geïnfecteerd met INH-resistente tuberkelbacteriën. Bij proef III geen INH, bij proef IV INH-therapie.

In tabel 19 wordt een overzicht gegeven van de proeven III en IV. Uit deze tabel blijkt, dat het aantal dieren met macroscopische resp. microscopische tuberculeuze afwijkingen en positieve orgaankweken bij proef III en proef IV niet significant verschilt. We mogen hieruit concluderen, dat het toedienen van INH geen invloed heeft gehad op het verloop van de tuberculeuze infectie veroorzaakt door INH-resistente bacteriën.

De ongunstige werking van INH-toediening bij een infectie met INH-resistente tuberkelbacteriën, zoals door MITCHISON (bladz. 30) is beschreven werd door ons niet waargenomen.

Periode	Proef	Aantal caviae	Macroscopie *)	Histologie *) ZN + en ZN —	Positieve orgaankweek *)
1e	III IV	22	5 (22,7%)	14 (63,5%)	20 (90,9%)
2e t/m 6e week		17	0	7 (41,1%)	13 (76,4%)
2e	III IV	10	3 (30%)	8 (80%)	7 (70%)
t/m 10e week		10	2 (20%)	6 (60%)	8 (80%)
3e	III IV	10	0	4 (40%)	4 (40%)
na 10e week		9	0	4 (44,4%)	2 (22,2%)

*) In de kolommen is het aantal caviae vermeld met minstens in één orgaan macroscopische, resp. histologische tuberculeuze afwijkingen of met een positieve kweek uit minstens één orgaan. De onderzochte organen zijn lever, milt en long.

Tabel 19.

Vergelijking van de macroscopie, histologie en orgaanculturen van twee proeven, waarbij caviae zijn geïnfecteerd met INH-resistente tuberkelbacteriën. Bij proef III geen INH-therapie, bij proef IV INH-therapie beginnend 4 weken na infectie. Infectieduur in 3 perioden verdeeld.

Bij de proeven I - II - III - IV werden lever, milt, long en nier van één dier met hetzelfde instrumentarium verwijderd. Bij de proeven 1, 2 en 3 werden deze organen, regionale lymphklier en infectieplaats elk met een apart mes en pincet verwijderd, zodat nauwkeuriger aangegeven kan worden uit welk orgaan een positieve tuberkelbacteriëncultuur afkomstig is.

Proef 1.

40 caviae met een gemiddeld gewicht van 578 gram werden met INH-sensibele, katalase-positieve tuberkelbacteriën, afkomstig uit het sputum van een andere onbehandelde patiënt geïnfecteerd. De gevoeligheid van de bacteriën voor INH was als volgt: bij een entdosis van 1 mg was er flinke groei op de controlebuis, terwijl de groei volledig werd geremd door 0,1 mcg INH/ml.

Resultaten

a. 7 caviae stierven en wel één 6 weken na infectie met een uitgebreide niet tuberculeuze peritonitis; 5 in de periode van 11 tot 14 weken na infectie, waarvan 2 aan een pneumococcenpneumonie, de overige 3 aan een uitgebreide orgaantuberculose. Eén cavia stierf na 20 weken aan uitgebreide tuberculose.

b. De eerste 10 weken bleef het gewicht bij 20 van de 26 caviae stijgen. Daarna daalde het gewicht bij 12 van de 14 dieren.

c. 6 weken na infectie was bij alle 40 caviae de Mantoux-reactie positief geworden.

d. Op de plaats van infectie en in de meestal vergrote regionale lymphklier was na 2 weken pus aanwezig, waaruit tuberkelbacteriën konden worden gekweekt. Deze bacteriën waren INH-gevoelig en katalase-positief.

e. Na 2 weken konden tuberkelbacteriën met hun oorspronkelijke resistentiepatroon uit de milt gekweekt worden.

f. 4 weken na de infectie waren de eerste macroscopische tuberculeuze afwijkingen aanwezig in de milt. De afwijkingen in lever en long traden pas na 11-14 weken op. De nieren bleven macroscopisch normaal.

g. De eerste histologische afwijkingen kwamen in de milt voor en wel 4 weken na infectie, later ook in de lever en long (8ste en 10e week). Hoewel de nieren histologisch ook normaal bleven, was het mogelijk tuberkelbacteriën uit 3 nieren te kweken. (Uit 2 nieren 13 weken na infectie en uit 1 nier 26 weken na infectie).

40 histologisch onderzochte milten vertoonden het volgende:

1. 7 waren normaal met negatieve culturen.
2. 6 waren normaal met positieve culturen.
3. 27 vertoonden tuberculeuze afwijkingen, waarvan 9 met een positieve Ziehl-Neelsen kleuring. Van deze 9 waren de kweken 2 keer negatief. Bij 18 milten was de ZN-kleuring negatief, doch van deze 18 was 13 keer de cultuur positief.

40 histologisch onderzochte levers vertoonden het volgende:

1. 26 waren normaal met negatieve culturen.
2. 5 waren normaal met positieve culturen.
3. 9 vertoonden tuberculeuze afwijkingen, waarvan 5 met een positieve Ziehl-Neelsen kleuring. Van deze 5 was de kweek 1 keer negatief. Bij 4 levers was de ZN-kleuring negatief, evenals de culturen.

39 histologisch onderzochte longen vertoonden het volgende: (1 long ging voor histologisch onderzoek verloren).

1. 21 waren normaal met negatieve culturen.
2. 5 waren normaal met positieve culturen.
3. 13 vertoonden tuberculeuze afwijkingen, waarvan 3 met een positieve Ziehl-Neelsen kleuring. Van deze 3 waren de kweken positief. Bij 10 longen was de ZN-kleuring negatief, doch van deze 10 was 6 keer de cultuur positief. 2 keer was de kweek verontreinigd.

Het histologisch beeld van de tuberculose in deze organen was gelijk aan dat der vorige proeven. Ook wanneer er duidelijke microscopische tuberculeuze afwijkingen met positieve orgaanculturen bestonden, bleek dat het aantonen van tuberkelbacteriën met de Ziehl-Neelsen kleuring vaak negatieve resultaten opleverde. Blijkbaar lieten de tuberkelbacteriën zich in het weefsel moeilijk kleuren en onderscheiden.

Proef 2.

41 caviae met een gemiddeld gewicht van 574 gram werden geïnfecteerd met INH-resistente tuberkelbacteriën afkomstig uit het sputum van een met INH behandelde patiënt. Deze cultuur had een verminderde katalase-activiteit (zuurstofontwikkeling na 31 seconden) en op de resistentiebuis was flinke groei, wanneer aan de voedingsbodem 30 mcg INH/ml was toegevoegd. Teneinde een zo hoog mogelijke graad van homogene resistentie te verkrijgen werd deze cultuur 3 keer overgeënt op een 30 mcg INH/ml bevattende voedingsbodem.

Resultaten

a. 3 dieren stierven, waarvan één 16½ week na infectie. De interne organen van dit dier waren macroscopisch en histologisch normaal. De beide andere stierven na 26 weken, 1 aan een pneumococcenpneumonie. Bij beide caviae werden noch macroscopisch, noch histologisch tuberculeuze afwijkingen gevonden.

b. De dieren bleven in gewicht stijgen tot aan het einde van de proefperiode.

c. 6 weken na infectie was bij alle dieren de Mantoux-reactie positief.

d. 2 weken na infectie bleek pus op de plaats van inspuiting aanwezig te zijn, meestal gepaard gaande met vergroting en abscessvorming van de regionale lymphklier. Uitzondering hierop vormden de beide caviae, die in de 26ste week stierven, hierbij waren injectieplaats en klier normaal. Bij 31 van de 41 caviae konden uit injectieplaats en/of lymphklier tuberkelbacteriën teruggekweekt worden; deze bacteriën waren resistent gebleven voor 30 mcg INH/ml, terwijl de katalase-activiteit verminderd bleef.

e. Na 2 weken konden tuberkelbacteriën met hun oorspronkelijke resistentie en katalase-activiteit uit milt, lever en long worden gekweekt.

f. Na 2 weken waren de eerste macroscopische tuberculeuze afwijkingen aanwezig in de lever, na vier weken ook in de milt. De longen en nieren bleven macroscopisch normaal.

g. 2 weken na infectie waren de eerste histologische afwijkingen aanwezig in milt en lever, na 4 weken ook, bij één cavia in de long. De nieren bleven histologisch normaal. Bij 3 van de 41 histologisch normale nieren waren de orgaankweken positief en wel bij 2 caviae 2 weken na infectie, bij de derde na 13 weken. De uit deze nieren gekweekte tuberkelbacteriën waren resistent voor 30 mcg INH.

39 histologisch onderzochte milten vertoonden het volgende: (2 milten gingen voor histologisch onderzoek verloren).

1. 11 waren normaal met negatieve culturen.
2. 6 waren normaal met positieve culturen.
3. 22 vertoonden tuberculeuze afwijkingen, waarvan 9 met een positieve Ziehl-Neelsen kleuring. Van deze 9 waren de kweken 2 keer negatief. Bij 13 milten was de ZN-kleuring negatief, doch van deze 13 was 4 keer de cultuur positief.

39 histologisch onderzochte levers vertoonden het volgende: (2 levers gingen voor histologisch onderzoek verloren).

1. 18 waren normaal met negatieve culturen.
2. 4 waren normaal met positieve culturen.
3. 17 vertoonden tuberculeuze afwijkingen, waarvan 3 met een positieve Ziehl-Neelsen kleuring. Van deze 3 waren alle 3 kweken negatief. Bij 14 levers was de ZN-kleuring negatief, doch van deze 14 was 3 keer de cultuur positief.

38 histologisch onderzochte longen vertoonden het volgende: (3 longen gingen voor histologisch onderzoek verloren).

1. 28 waren normaal met negatieve culturen.
2. 6 waren normaal met positieve culturen.
3. 4 vertoonden tuberculeuze afwijkingen. De Ziehl-Neelsen kleuring was hierbij steeds negatief, doch van deze 4 longen was de cultuur één keer positief.

Het histologisch beeld van de tuberculeuze afwijkingen in milt, lever en long was gelijk aan dat van de vorige proeven. Ook bij een infectie met INH-resistente tuberkelbacteriën waren de bacteriën in het microscopisch preparaat moeilijk te kleuren, gezien het vrij frequent voor-

komen van histologische tuberculeuze afwijkingen met positieve orgaanculturen, maar met een negatieve Ziehl-Neelsen kleuring.

Proef 3.

30 caviae met een gemiddeld gewicht van 592 gram werden met dezelfde, voor 30 mcg INH/ml resistente, cultuur geïnfecteerd als bij proef 2, doch nu werden de dieren met INH behandeld.

Resultaten

a. 5 dieren stierven aan een pneumococcenpneumonie binnen 20 weken na infectie.

b. Het gewicht van de dieren bij deze proef was nogal wisselend, soms steeg het gewicht eerst en daalde daarna, of omgekeerd. De 5 dieren die na de 20ste week werden onderzocht vertoonden een geleidelijke stijging van het gewicht.

c. 6 weken na infectie was bij alle dieren de Mantoux-reactie positief.

d. De dieren die na 2 weken therapie werden onderzocht toonden pus op de infectieplaats, meestal gepaard gaande met vergroting van de lymphklier. 23 van de 30 caviae hadden deze locale afwijkingen. Uit de locale afwijkingen konden 17 keer tuberkelbacteriën worden gekweekt, met dezelfde resistentie en katalase-reactie als van de oorspronkelijke bacteriën.

e. Na 6 weken, toen de eerste dieren werden onderzocht, waren de orgaankweken van milt en lever positief en na 8 weken ook uit de long. Resistentie en katalase-reactie waren gelijk aan die van de cultuur waarmee was besmet.

f. Slechts in 2 gevallen werden macroscopische afwijkingen gevonden, bij het ene dier 10 weken na infectie in milt en lever, bij het andere dier na 26 weken. Longen en nieren van deze 2 dieren waren normaal.

g. Na 6 weken bestonden histologische afwijkingen in milt en lever, na 8 weken ook in de long. De nieren bleken histologisch normaal, terwijl alle nierkweken negatief waren.

30 histologisch onderzochte milten vertoonden het volgende:

1. 7 waren normaal met negatieve culturen. Van één milt was de histologie normaal en bleek de kweek te zijn verontreinigd.
2. 2 waren normaal met positieve culturen.
3. 20 vertoonden tuberculeuze afwijkingen, waarvan 6 met een positieve Ziehl-Neelsen kleuring. Van deze 6 was de kweek 3 keer negatief. Bij 14 milten was de ZN-kleuring negatief, doch van deze 14 was 5 keer de cultuur positief.

30 histologisch onderzochte levers vertoonden het volgende:

1. 16 waren normaal met negatieve culturen.
2. 1 was normaal met positieve cultuur.
3. 13 vertoonden tuberculeuze afwijkingen, waarvan 2 met een positieve Ziehl-Neelsen kleuring. Van beide levers was de cultuur negatief. Bij 11 levers was de ZN-kleuring negatief, doch van deze 11 was 4 keer de cultuur positief.

30 histologisch onderzochte longen vertoonden het volgende:

1. 26 waren normaal met negatieve culturen.
2. 1 was normaal met positieve cultuur.
3. 3 vertoonden tuberculeuze afwijkingen, waarvan 1 met een positieve Ziehl-Neelsen kleuring. De cultuur van deze long was negatief. Bij 2 longen was zowel de ZN-kleuring als de cultuur negatief.

Het histologisch beeld van de tuberculose in deze organen verschilde niet van dat der vorige proeven.

Een overzicht van de proeven 1, 2 en 3 wordt gegeven in de tabellen 20, 21, 22 en 23. Zoals reeds werd vermeld, werden bij deze proeven de organen elk met een eigen instrumentarium verwijderd; een positieve cultuur uit een orgaan is dan ook met vrij grote zekerheid uit dat orgaan afkomstig.

Zowel de dieren, welke met een sensibele cultuur, als die welke met een resistente cultuur tuberkelbacteriën waren besmet, hadden 6 weken na infectie een positieve tuberculinereactie.

Bij de caviae die met INH-sensibele bacteriën werden besmet daalde het gewicht in het verloop van de infectie, na besmetting met resistente bacteriën bleef het gewicht in het algemeen stijgen.

	1e periode 2e t/m 6e week			2e periode t/m 10e week			3e periode na 10e week		
	Totaal aantal organen	Aantal organen met macr. afwijkingen	%	Totaal aantal organen	Aantal organen met macr. afwijkingen	%	Totaal aantal organen	Aantal organen met macr. afwijkingen	%
Sens. lever *)	16	0	0	10	0	0	14	5	35.7
Res. lever **)	15	2	13.3	14	0	0	12	0	0
R + INH lever***)	5	0	0	11	1	9	14	1	7.1
Sens. milt *)	16	11	68.7	10	5	50	14	11	78.5
Res. milt **)	15	2	13.3	14	2	14.2	12	0	0
R + INH milt ***)	5	0	0	11	1	9	14	1	7.1
Sens. long *)	16	0	0	10	0	0	14	7	50
Res. long **)	15	0	0	14	0	0	12	0	0
R + INH long***)	5	0	0	11	0	0	14	0	0

Tabel 20.

Overzicht van de proeven 1, 2 en 3.

Macroscopische tuberculeuze afwijkingen in lever, milt en long van caviae na infectie met INH-sensibele of INH-resistente tuberkelbacteriën. Infectieduur in drie perioden verdeeld.

*) *Lever, milt of long van cavia geïnfecteerd met sensibele bacteriën (proef 1).*

**) *Lever, milt of long van cavia geïnfecteerd met resistente bacteriën (proef 2).*

***) *Lever, milt of long van cavia geïnfecteerd met resistente bacteriën en behandeld met INH (proef 3).*

Uit tabel 20 valt af te lezen:

De macroscopische afwijkingen treden het eerst op in de milt. De twee caviae uit de eerste periode met macroscopische afwijkingen in lever en milt waren dezelfde dieren. Verder blijkt, dat de macroscopische afwijkingen het vaakst in de milt voorkomen. Bij infectie met resistente tuberkelbacteriën treden macroscopische tuberculeuze milt-afwijkingen minder frequent op dan na infectie met sensibele tuberkelbacteriën. Dit verschil is statistisch significant in de eerste en derde periode ($p < 0,01$ en $p < 0,001$). In de derde periode komen macro-

scopische afwijkingen in lever en long na infectie met resistente bacteriën eveneens minder frequent voor dan na besmetting met sensibele bacteriën (Voor de lever- en longafwijkingen $p = \text{resp. } 0,03 \text{ en } 0,05$).

Terwijl in de laatste fasen der infectie met INH-resistente bacteriën het aantal caviae met macroscopische afwijkingen in de interne organen zeer gering blijft, is dat aantal na besmetting met INH-sensibele bacteriën in het verloop van de infectie daarentegen duidelijk toegenomen.

De uitkomsten van het macroscopisch onderzoek van de proeven 1 en 2 correleren met die van de proeven I en III en met de bevindingen die hierover in de literatuur zijn vermeld (bladz. 10).

Evenals bij proef IV blijkt dat het toedienen van INH bij een infectie met INH-resistente bacteriën geen invloed heeft op de macroscopische afwijkingen.

	1e periode 2e t/m 6e week			2e periode t/m 10e week			3e periode na 10e week		
	Totaal aantal organen	Aantal organen met positieve kweek	%	Totaal aantal organen	Aantal organen met positieve kweek	%	Totaal aantal organen	Aantal organen met positieve kweek	%
Sens. lever *)	16	1	6.2	10	2	20	14	6	42.8
Res. lever **)	15	4	26.6	14	0	0	12	2	16.6
R + INH lever***)	5	1	20	11	2	18.1	14	2	14.2
Sens. milt *)	16	9	56.2	10	8	80	14	8	57.1
Res. milt **)	15	12	80	14	1	7.1	12	2	16.6
R + INH milt ***)	5	2	40	11	7	63.6	14	1	7.1
Sens. long *)	16	3	18.5	10	3	30	14	8	57.1
Res. long **)	15	5	33.3	14	0	0	12	2	16.6
R + INH long***)	5	0	0	11	2	18.1	14	0	0

Tabel 21.

Overzicht van de proeven 1, 2 en 3.

Positieve orgaankweken van lever, milt en long van caviae na infectie met INH-sensibele of INH-resistente tuberkelbacteriën. Infectieduur in drie perioden verdeeld.

*), **) en ***) zie tabel 20.

Naar aanleiding van tabel 21 valt het volgende op te merken omtrent de kweekbaarheid van tuberkelbacteriën uit de organen.

In de eerste periode der infectie, zowel met sensibele als met resistente bacteriën, kunnen in een vrij groot percentage tuberkelbacteriën uit de organen worden gekweekt. Twee weken na de infectie kunnen sensibele en resistente tuberkelbacteriën met de kweekmethode in de organen worden aangetoond. Dit wijst erop, dat de resistente bacteriën zich binnen twee weken vanuit de infectieplaats hebben verspreid en vermeerderd. Evenals bij proef III vinden we hier geen aanwijzingen voor een „verminderd invasief vermogen” van INH-resistente tuberkelbacteriën.

De percentages positieve orgaankweken die bij een infectie met resistente bacteriën worden gevonden zijn lager dan na besmetting met sensibele bacteriën. In de eerste 6 weken bestaat dit verschil nog niet. Het aantal positieve miltkweken in de tweede periode van proef 2 is significant lager dan dat uit dezelfde periode van proef 1 ($p < 0,001$). Ook na de 10e week ligt het aantal positieve orgaankweken na infectie met resistente tuberkelbacteriën lager, dan na infectie met gevoelige. De leverkweken in deze 3e periode liggen wel lager, echter niet significant. Voor de milt- en longkweken nadert het verschil de significantie ($p = 0,04$).

In het verloop van de infectie met resistente tuberkelbacteriën treedt een daling op van het aantal positieve orgaanculturen. Deze daling is voor de orgaankweken van de caviae besmet met resistente bacteriën (proef 2) reeds duidelijk in de tweede periode, terwijl deze daling voor de cavia-organen van proef 3 in de tweede periode nog niet aanwezig is. In de derde periode echter bestaat voor alle organen uit proef 2 en 3 een afname in de positieve kweken t.o.v. de eerste periode. Deze daling is significant voor de miltkweken ($p = 0,004$).

Bij de met sensibele bacteriën geïnfecteerde dieren (proef 1) echter nemen de positieve orgaankweken in het verloop van de infectie toe.

De uitkomsten van de orgaanculturen bij de proeven 1 en 2 zijn identiek met die van proef I en III (zie tabel 14) en zijn in overeenstemming met de waarnemingen van MEISSNER (bladz. 13).

Uit het verloop van de orgaankweken van proef 2 en 3 is het nauwelijks mogelijk conclusies te maken wat betreft de invloed van

INH op de resistente tuberkelbacteriën. Alleen uit het hogere percentage positieve miltkweken in de tweede periode van proef 3 (63,6%) mag men niet concluderen, dat INH een ongunstige invloed heeft op een infectie met resistente bacteriën.

	1e periode 2e t/m 6e week			2e periode t/m 10e week			3e periode na 10e week		
	Totaal aantal	Aantal positieve kweken	%	Totaal aantal	Aantal positieve kweken	%	Totaal aantal	Aantal positieve kweken	%
Sens. *)	16	13	81.2	10	9	90	14	12	85.7
Res. **)	15	15	100	14	11	78.5	12	5	41.6
R + INH ***)	5	4	80	11	9	81.8	14	4	28.5

Tabel 22.

Overzicht van de proeven 1, 2 en 3. Positieve kweken van injectieplaats en/of regionale lieslymfklier van caviae na infectie met INH-sensibele of INH-resistente tuberkelbacteriën. Infectieduur in drie perioden verdeeld.

- *) *Injectieplaats en/of regionale lymphklier van caviae geïnfecteerd met sensibele bacteriën (proef 1).*
 **) *Injectieplaats en/of regionale lymphklier van caviae geïnfecteerd met resistente bacteriën (proef 2).*
 ***) *Injectieplaats en/of regionale lymphklier van caviae geïnfecteerd met resistente bacteriën en behandeld met INH (proef 3).*

Naar aanleiding van tabel 22 kan onderstaande worden geconcludeerd.

In de eerste periode is het aantal positieve kweken van injectieplaats en/of regionale lymphklier bij proef 1 en proef 2 vrijwel even hoog. Het aantal positieve kweken uit deze locale afwijkingen blijft in het verloop van de infectie met INH-sensibele bacteriën nagenoeg gelijk. Bij de infectie met resistente bacteriën is dit aantal in de derde periode echter duidelijk lager dan in de eerste periode ($p < 0,001$). Na de 10e week is er daardoor een duidelijk verschil in het aantal positieve kweken van proef 1 en 2 ($p = 0,025$).

Het kunnen kweken van INH-resistente bacteriën uit deze locale afwijkingen wordt niet beïnvloed door INH.

	1e periode 2e t/m 6e week			2e periode t/m 10e week			3e periode na 10e week		
	Totaal aantal organen	Aantal organen met histol. afwijkingen	%	Totaal aantal organen	Aantal organen met histol. afwijkingen	%	Totaal aantal organen	Aantal organen met histol. afwijkingen	%
Sens. lever *)	16	2	12.5	10	1	10	14	6	43
Res. lever **)	15	6	40	13	7	54	11	4	36
R + INH lever***)	5	3	60	11	5	45	14	5	36
Sens. milt *)	16	9	56	10	5	50	14	13	93
Res. milt **)	15	11	73	13	7	54	11	4	36
R + INH milt***)	5	5	100	11	9	82	14	6	43
Sens. long *)	15	0	0	10	4	40	14	9	64
Res. long **)	15	2	13	12	1	8	11	1	9
R + INH long***)	5	0	0	11	2	18	14	1	7

Tabel 23.

Overzicht van de proeven 1, 2 en 3. Histologische tuberculeuze afwijkingen, zowel met positieve als negatieve ZN-kleuring in de coupe, in lever, milt en long van caviae na infectie met INH-sensibele of INH-resistente tuberkelbacteriën. Infectieduur in drie perioden verdeeld.

*), **) en ***) zie tabel 20.

Tabel 23 geeft een overzicht van de histologische afwijkingen. Hieruit is het volgende af te leiden.

Histologische afwijkingen worden reeds in de eerste periode van de infectie frequent gezien, ook bij een besmetting met INH-resistente tuberkelbacteriën. Het verschil tussen het verloop van de infectie met beide soorten bacteriën wordt ook hier duidelijk na de 10e week. Bij infectie met sensibele bacteriën is er een toename van de histologische afwijkingen naarmate de infectie langer heeft bestaan, bij de resistente bacteriën daarentegen daalt het aantal dieren met histologische afwijkingen in de organen naarmate de infectie langer bestaat.

In de derde periode is het aantal milten met microscopische afwijkingen bij proef 2 significant lager dan bij proef 1 ($p = 0,004$). Hetzelfde geldt voor de long ($p < 0,01$).

Het lijkt alsof de histologische afwijkingen zonder restafwijkingen teruggaan omdat bij dit onderzoek geen littekens waargenomen worden.

De resultaten van het histologisch onderzoek van de organen bij de proeven 1 en 2 zijn identiek met die van proef I en III (tabel 13).

HISTOLOGISCH BEELD

Het histologisch beeld van de tuberculeuze afwijkingen veroorzaakt door INH-sensibele of INH-resistente tuberkelbacteriën is vrijwel gelijk, nl. epitheloidceltuberkels met in sommige gevallen geringe verkazing. Daar de uit de organen teruggekweekte tuberkelbacteriën hun oorspronkelijk resistentiepatroon hadden behouden mogen we aannemen, dat de histologische afwijkingen ook het gevolg zijn van sensibele, respectievelijk INH-resistente bacteriën.

Bij infectie met sensibele bacteriën worden in enkele gevallen exsudatief-necrotische afwijkingen in de milt gezien; bij de resistente bacteriën worden deze niet waargenomen.

Reuscellen komen bij beide soorten infecties zeer sporadisch voor. De reuscellen welke gevonden worden bij een infectie met resistente bacteriën verschillen niet van die, welke bij sensibele bacteriën worden aangetroffen.

Zowel na infectie met sensibele als met resistente bacteriën blijft in de tuberkels een duidelijk netwerk van argentophile vezels aanwezig, het fraaist zichtbaar in de levertuberkels.

De door VINK beschreven fibrosering in en rond de tuberkels bij een infectie met resistente bacteriën wordt in ons materiaal niet waargenomen (bladz. 19). Ook de door PLIQUETT en KRACHT genoemde „Retothelknötchen” zijn niet gezien (bladz. 18).

De tabellen 24 en 25 geven een overzicht van het histologisch beeld in correlatie met de door de ZN-kleuring en kweekmethode aange- toonde tuberkelbacteriën.

	Aantal organen				
	Histol. tbc. afw.	ZN + kweek +	ZN + kweek —	ZN — kweek +	ZN — kweek —
Sens. lever *)	9	4	1	—	4
Res. lever **)	17	—	3	3	11
R + INH lever***)	13	—	2	4	7
Sens. milt *)	27	7	2	13	5
Res. milt **)	22	7	2	4	9
R + INH milt ***)	20	3	3	5	9
Sens. long *)	13	3	—	6	2 ^o)
Res. long **)	4	—	—	1	3
R + INH long ***)	3	—	1	—	2

*), **) en ***) zie tabel 20.

^o) twee kweken verontreinigd.

Tabel 24.

Histologische tuberculeuze afwijkingen en de aantoonbaarheid van tuberkelbacteriën in lever, milt en long na infectie met INH-sensibele of INH-resistente bacteriën. Tuberkelbacteriën zijn aangetoond met ZN-kleuring van de coupe en de kweek van het orgaan.

	Aantal histologisch normale organen	Aantal organen met normale histologie en pos. kweek	%
Sens. lever *)	31	5	16
Res. lever **)	22	4	18
R + INH lever***)	17	1	5
Sens. milt *)	13	6	46
Res. milt **)	17	6	35
R + INH milt***)	10	2	20
Sens. long *)	26	5	19
Res. long **)	34	6	17
R + INH long***)	27	1	3

*), **) en ***) zie tabel 20.

Tabel 25.

Cavia-organen zonder histologische afwijkingen maar met een positieve orgaankweek na infectie met INH-sensibele of INH-resistente bacteriën.

Uit de tabellen 24 en 25 blijkt, dat er in een aantal gevallen een discrepantie bestaat tussen de histologische bevindingen en de uitkomsten van de orgaankweken. Soms was het histologisch beeld

positief voor tuberculose en was de cultuur negatief, doch het omgekeerde, een normale histologie met een positieve kweek kwam eveneens voor. Na infectie met INH-sensibele bacteriën werden 27 milten histologisch positief voor tuberculose, 7 (= 25%) van deze milten hadden echter een negatieve kweek. 13 milten werden histologisch normaal bevonden, de kweek was 6 keer (= 46%) positief. Deze discrepantie tussen histologie en kweekbaarheid van tuberkelbacteriën werd zowel bij de infectie met sensibele als met resistente bacteriën en in elke fase van de infectie waargenomen.

Het veelvuldig voorkomen van histologische tuberculeuze afwijkingen met een positieve kweek en een negatieve ZN-kleuring van de coupe zou erop kunnen wijzen, dat tuberkelbacteriën zich in de weefsels, met de kleuring volgens Ziehl-Neelsen, moeilijk laten kleuren. Dit is in overeenstemming met hetgeen KOCH en COTE (1965) met behulp van fluorescerende kleurstoffen waarnemen. Ook zij vinden, dat tuberkelbacteriën zich soms in de weefsels niet laten aantonen met een ZN-kleuring, terwijl ze met fluorescentiemicroscopie duidelijk aanwezig zijn.

SAMENVATTING EN CONCLUSIES

Dit onderzoek had tot doel het verloop van een tuberculeuze infectie bij caviae met een negatieve Mantoux-reactie na te gaan, wanneer deze dieren werden besmet met verschillende culturen tuberkelbacteriën. In het bijzonder is aandacht besteed aan een besmetting met hoog INH-resistente tuberkelbacteriën. Tevens werd de invloed van isonicotinezuurhydrazide (INH) bij deze infecties onderzocht.

In hoofdstuk I zijn de voornaamste eigenschappen van INH-resistente tuberkelbacteriën genoemd (par. 1 t/m 5). In par. 6 is het probleem van INH-resistente tuberkelbacteriën bij de mens vanuit de literatuur benaderd.

Hoofdstuk II vermeldt factoren, die de werking van INH in het dierexperiment beïnvloeden.

Hoofdstuk III geeft het eigen onderzoek weer.

Uit proef A en I bleek, dat er tussen het verloop van een infectie teweegebracht door een INH-sensibele laboratoriumstam H37Rv en een INH-sensibele tuberkelbacteriëncultuur uit het sputum van een onbehandelde patiënt verschil bestond (tabel 7, bladz. 39). De caviae geïnfecteerd met de laboratoriumstam hadden een langere overlevings-tijd dan die, welke waren besmet met de sputumcultuur. Het gewicht van de dieren na infectie met de laboratoriumstam bleef gedurende de observatieperiode van 26 weken stijgen, terwijl na besmetting met de sputumcultuur een daling van het caviagewicht optrad. Verder waren de macroscopische miltafwijkingen na infectie met de laboratoriumstam minder uitgebreid dan bij de sputumcultuur. Bij de laboratoriumstam traden macroscopische en microscopische tuberculeuze afwijkingen in milt, lever of long later op dan na infectie met de sputumcultuur. In de eerste 10 weken van de infectie is het percentage caviae met macroscopische en microscopische tuberculeuze afwijkingen in milt, lever of long significant lager bij de laboratoriumstam dan bij de sputumcultuur (fig. 1 en 2). Het percentage positieve kweken uit deze organen is in de eerste 6 weken van de infectie met de laboratoriumstam lager dan bij infectie met de sputumcultuur (fig. 3).

Behoudens het soms voorkomen van exsudatief-necrotische afwijkingen in de milt na infectie met de sputumcultuur bestonden bij het histologisch onderzoek, verricht met haematoxyline-eosine, Azan en reticulinekleuring, geen verschillen in de aard van de histologische

tuberculeuze afwijkingen in milt, lever of long, die ontstonden na de besmetting met de laboratoriumstam of de sputumcultuur.

CONCLUSIE: De INH-sensibele laboratoriumstam H37Rv is minder virulent voor de caviae dan een INH-sensibele tuberkelbacteriëncultuur uit het sputum van een onbehandelde patiënt. Deze verminderde virulentie komt tot uiting in de eerste 10 weken van de infectie. Het histologisch beeld van de tuberculose in milt, lever of long na infectie met de laboratoriumstam of de sputumcultuur is identiek.

Uit de proeven B en II werden inlichtingen verkregen over de therapeutische werking van INH bij een infectie met de INH-sensibele laboratoriumstam en de INH-sensibele sputumcultuur (tabel 4 en 9, bladz. 36 en 42). Bij de infectie met de laboratoriumstam en behandeling met INH konden gedurende de gehele observatieperiode van 26 weken geen macroscopische of histologische tuberculeuze afwijkingen in de milt, lever of long worden gevonden, terwijl bij de infectie met de sputumcultuur en behandeling met INH tot en met de 10e week nog macroscopische en microscopische afwijkingen werden aangetroffen. De invloed van INH werd vooral duidelijk uit de kweekbaarheid van tuberkelbacteriën uit de caviae na de 10e week van de infectie. Na besmetting met de laboratoriumstam en toediening van INH konden in de periode na de 10e week geen tuberkelbacteriën meer uit de caviae worden gekweekt. Bij de infectie met de sputumcultuur was dit bij de meerderheid van de caviae nog mogelijk. Het bleek dus, dat INH een effectievere werking had bij de infectie met de minst virulente, nl. de laboratoriumstam.

Zowel bij de infectie met de laboratoriumstam als met de sputumcultuur werd bij enkele caviae de Mantoux-reactie, die 6-7 weken na besmetting positief was geworden, na behandeling met INH weer negatief. Bij enkele dieren konden, ondanks een negatief geworden tuberculinereactie, tuberkelbacteriën uit interne organen worden gekweekt.

CONCLUSIE: De therapeutische werking van INH bij experimentele caviatuberculose wordt mede bepaald door de virulentie van de verwekker. De Mantoux-reactie die bij de caviatuberculose positief wordt, kan tijdens INH-behandeling weer negatief worden.

Bij de proeven I en III, 1 en 2 werd een infectie met INH-sensibele tuberkelbacteriën (proef I en 1) vergeleken met die veroorzaakt door een tuberkelbacteriëncultuur, welke homogeen resistent gemaakt was voor minstens 30 mcg INH/ml (proef III en 2).

Zowel na infectie met resistente als met sensibele tuberkelbacteriën bleek de Mantoux-reactie van de caviae 6 weken na infectie positief te zijn. In dat opzicht waren de infecties gelijk, doch verder bleken er duidelijke verschillen tussen beide infecties te bestaan. De caviae die waren besmet met INH-resistente bacteriën konden 26 weken worden vervolgd en die, welke waren geïnfecteerd met sensibele bacteriën slechts 14 weken, deze laatste dieren stierven aan de tuberculeuze infectie. Bij de caviae, die met INH-resistente bacteriën werden besmet, steeg het gewicht in het verloop van de infectie, na besmetting met INH-sensibele bacteriën daalde het gewicht. De macroscopische afwijkingen in de milt waren bij de infectie met de resistente bacteriën minder uitgebreid dan na infectie met sensibele tuberkelbacteriën. Het aantal caviae met macroscopische tuberculeuze afwijkingen in milt, lever of long na infectie met resistente bacteriën was lager dan na besmetting met sensibele bacteriën. Het verschil in macroscopische afwijkingen is significant gedurende het gehele verloop van de infectie voor wat betreft de proeven I en III (tabel 12, bladz. 47) en bij de proeven 1 en 2 zijn de macroscopische miltafwijkingen significant minder frequent aanwezig na infectie met resistente bacteriën en wel in de eerste 6 weken en na de 10e week (tabel 20, bladz. 60). Het aantal dieren met histologische afwijkingen in de milt na infectie met resistente bacteriën is significant lager dan na infectie met sensibele bacteriën; bij de proeven I en III (tabel 13, bladz. 48) is dit verschil significant na de 6e week; bij de proeven 1 en 2 (tabel 23, bladz. 64) is er een duidelijke significantie na de 10e week. Ook is het aantal positieve orgaankweken van de caviae, die met resistente bacteriën zijn geïnfecteerd kleiner dan dat van de caviae, die met INH-sensibele bacteriën zijn besmet. De verschillen zijn significant voor wat betreft de proeven I en III na de 6e week (tabel 14, bladz. 48) en bij de proeven 1 en 2 verschillen de positieve miltkweken significant in de periode tussen de 7e en 11e week, daarna nadert het verschil de significantie (tabel 21, bladz. 61).

Uit overlevingstijd, gewichtsverloop, uitgebreidheid van de macroscopische miltafwijkingen, aantal dieren met macroscopische en histologische afwijkingen en kweekbaarheid van de tuberkelbacteriën uit

de organen kon dus t.o.v. een INH-sensibele tuberkelbacteriëncultuur een verminderde virulentie van hoog INH-resistente tuberkelbacteriën voor caviae worden vastgesteld. Deze verminderde virulentie werd vooral gezien na de 10e week van infectie.

Het kunnen kweken van sensibele tuberkelbacteriën uit interne organen en het vinden van histologische tuberculeuze afwijkingen in deze organen gedurende de eerste 2 weken van de infectie met INH-sensibele tuberkelbacteriën wees erop, dat de sensibele tuberkelbacteriën zich binnen 2 weken vanuit de infectieplaats hadden verspreid en vermeerderd. Hetzelfde werd waargenomen bij die caviae, die met INH-resistente bacteriën waren geïnfecteerd. Een „verminderd invasief vermogen” dat MEISSNER (1959) aan INH-resistente tuberkelbacteriën toekent konden wij dus niet aantonen.

Verder bleek in het verloop van de infectie met resistente bacteriën een daling op te treden van het aantal dieren met macroscopische en histologische tuberculeuze afwijkingen, tevens nam het aantal caviae met positieve orgaanculturen af. Het tuberculeus proces verliep bij de resistente bacteriën dus regressief. Het afsterven van de resistente tuberkelbacteriën valt bij dit regressief verloop op. In tegenstelling met de infectie door resistente bacteriën zagen we bij een infectie met sensibele bacteriën, dat het aantal caviae met macroscopische resp. histologische afwijkingen en positieve orgaankweken met de tijdsduur van de infectie toeneemt. Het tuberculeus proces bij de sensibele bacteriën verliep dus progressief.

Wanneer de ene infectie regressief verloopt en de andere progressief, moet er tussen beide infecties dan ook een verschil gevonden worden, wanneer deze infecties enige tijd hebben bestaan. Inderdaad bleek uit onze proeven, dat vooral na de 10e week de percentages van de caviae met macroscopische en histologische afwijkingen en die met positieve orgaankweken duidelijk lager waren bij infectie met resistente bacteriën, dan na besmetting met sensibele bacteriën.

Het regressieve en progressieve verloop van de infecties met INH-resistente en INH-sensibele tuberkelbacteriën komt uit de figuren 1, 2 en 3 naar voren.

CONCLUSIE: Vergeleken met een INH-sensibele tuberkelbacteriëncultuur is een hoog INH-resistente tuberkelbacteriëncultuur verminderd virulent voor de caviae. Deze verminderde virulentie van INH-resistente tuberkelbacteriën komt vooral tot uiting na

de 10e week van de infectie. De verspreiding en vermeerdering van de tuberkelbacteriën vanuit de infectieplaats naar de cavia-organen gebeurt zowel bij INH-sensibele als bij INH-resistente tuberkelbacteriën binnen 2 weken. Het verloop van een infectie bij caviae door INH-resistente tuberkelbacteriën is regressief terwijl INH-sensibele bacteriën de tuberculose progressief doet verlopen.

Op bladz. 69 werd reeds opgemerkt, dat de INH-sensibele laboratoriumstam H37Rv zijn verminderde virulentie voor de caviae toonde in de eerste 10 weken van de infectie, terwijl zoals vorengenoemd de verminderde virulentie van INH-resistente tuberkelbacteriën na de 10e week tot uiting kwam. Een infectie met de laboratoriumstam H37Rv komt „moeilijk op gang”, doch wordt langzaam progressief; een infectie met INH-resistente tuberkelbacteriën komt echter „goed op gang”, doch wordt daarna regressief. Het verloop van de infecties met de laboratoriumstam en de INH-resistente cultuur is in de figuren 1, 2 en 3 schematisch weergegeven.

CONCLUSIE: Verminderde virulentie voor caviae van tuberkelbacteriën kan zich dus op verschillende wijzen uiten.

Bij de proeven III en IV (tabel 19, bladz. 53), 2 en 3 (tabel 20, 21, 22, 23, bladz. 60, 61, 63 en 64) werd de invloed nagegaan van INH-behandeling bij een infectie met hoog INH-resistente tuberkelbacteriën. INH-therapie bij een dergelijke infectie had geen significante invloed op de macroscopische en microscopische orgaanafwijkingen en op de kweekbaarheid van de tuberkelbacteriën uit de caviae. Een ongunstige invloed van INH bij een infectie met hoog INH-resistente tuberkelbacteriën, zoals in de literatuur is beschreven (bladz. 30) bleek niet uit onze proeven.

CONCLUSIE: INH heeft in onze proeven geen invloed bij een cavia-infectie met hoog INH-resistente tuberkelbacteriën.

Met behulp van haematoxyline-eosine, Azan en reticulinekleuring werd histologisch onderzoek van lever, milt en long verricht. Hierbij bleek, dat alleen bij de infectie met INH-sensibele tuberkelbacteriën in de milt soms exsudatief-necrotische afwijkingen voorkwamen, doch

dat er verder geen verschil bestond in de aard van de histologische tuberculeuze afwijkingen als gevolg van een infectie met INH-sensibele of INH-resistente bacteriën. De uit de organen teruggekweekte tuberkelbacteriën hadden hun oorspronkelijke resistentiepatroon behouden, zodat aangenomen moet worden, dat de afwijkingen ook werkelijk het gevolg waren van INH-sensibele, resp. INH-resistente bacteriën.

De door KRACHT en PLIQUETT (1960) beschreven „Retothelknötchen”, die na besmetting met INH-resistente bacteriën in de lever zouden voorkomen, werden in ons materiaal niet waargenomen. Fibrosering der tuberkels na infectie met INH-resistente bacteriën, zoals door VINK en medewerkers (1956) is vermeld, werd door ons niet gezien. Het ontbreken van „Retothelknötchen” en fibrosering zou samen kunnen hangen met verschil in infectiedosis en de resistentiegraad van de gebruikte tuberkelbacteriën.

CONCLUSIE: Behoudens het soms voorkomen van exsudatief-necrotische afwijkingen in de milt na infectie met INH-sensibele bacteriën, bestaat er in de aard van de histologische tuberculeuze afwijkingen in milt, lever of long van caviae na infectie met INH-sensibele of hoog INH-resistente tuberkelbacteriën geen verschil.

Bij het histologisch onderzoek van de caviaorganen werd in een aantal gevallen een discrepantie gevonden tussen de histologische bevindingen en de aantoonbaarheid van tuberkelbacteriën in het orgaan, hetzij met de Ziehl-Neelsen kleuring van de coupe of met de orgaancultuur (tabel 24 en 25, bladz. 66).

Het frequent voorkomen van duidelijke tuberculeuze afwijkingen in de milt, lever of long van de cavia met een negatieve Ziehl-Neelsen kleuring van de coupe, zou erop kunnen wijzen, dat tuberkelbacteriën zich met deze kleuring in de weefsels moeilijk laten aantonen. Verder kwam het voor dat het histologisch beeld positief was voor tuberculose, terwijl de kweek van hetzelfde orgaan negatief was. Het omgekeerde, een negatieve histologie met positieve orgaankweek kwam eveneens voor. Deze discrepantie werd zowel gezien bij infecties met sensibele als resistente tuberkelbacteriën.

De discrepantie die er soms bestaat tussen histologisch onderzoek en orgaankweek kan praktische betekenis hebben, nl. wanneer men materiaal (sputum, urine, pleuravocht, menstrueel bloed of punctaten) op de aanwezigheid van tuberkelbacteriën wil onderzoeken met behulp

van cavia-enting. Het is dan van belang om naast de cultuur van de milt histologie van dit orgaan te doen en wel speciaal van de milt, daar hieruit het eerst en het vaakst positieve uitkomsten werden verkregen. In een aantal gevallen zal zo een positief resultaat ontstaan.

CONCLUSIE: Het histologisch onderzoek van de milt, lever of long van caviae na infectie met INH-sensibele of INH-resistente tuberkelbacteriën is soms in strijd met de aantoonbaarheid van de tuberkelbacteriën in het orgaan, hetzij met de Ziehl-Neelsen kleuring of met de orgaankweek. Het histologisch beeld kan positief zijn voor tuberculose, terwijl de orgaankweek negatief is. Ook kan de histologie negatief zijn en de kweek positief. Wanneer cavia-enting als diagnostisch hulpmiddel wordt gebruikt om tuberkelbacteriën in bepaald materiaal aan te tonen is het daarom aan te bevelen om van het dier naast de Mantoux-reactie en het onderzoek van injectieplaats of regionale lymphklier orgaankweek van de milt en histologisch onderzoek van dit orgaan te verrichten.

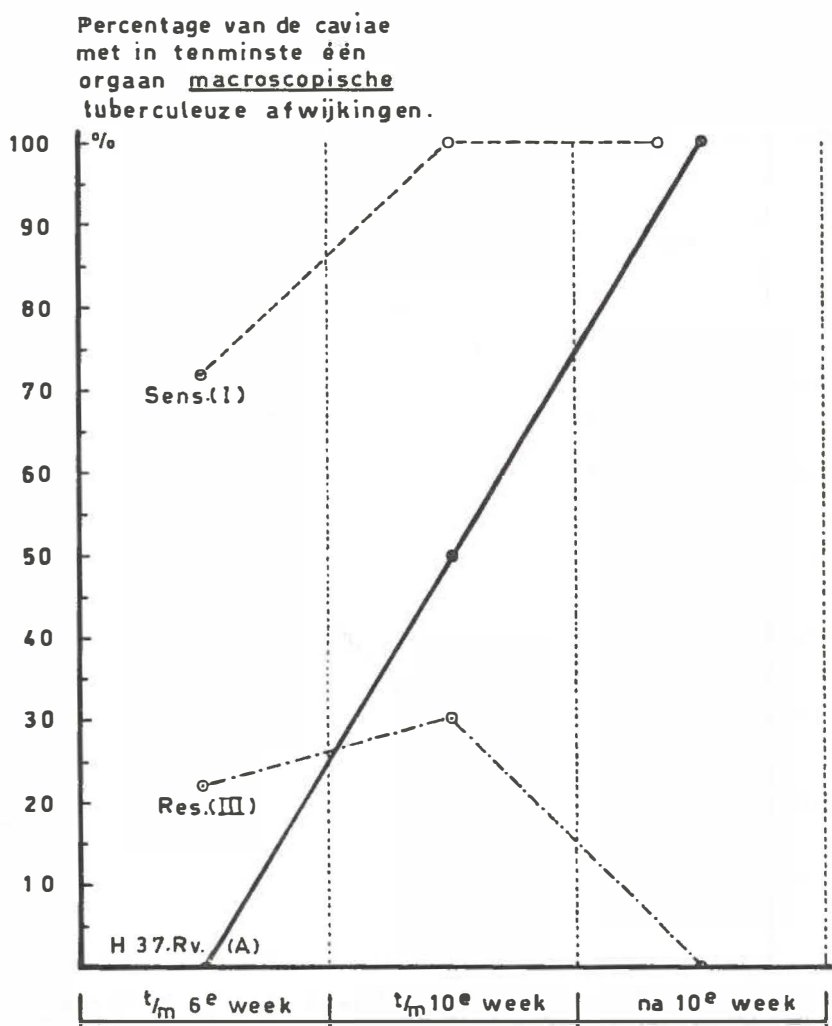


Fig. 1.

Verloop van de macroscopische tuberculeuze afwijkingen bij caviae na infectie met een INH-sensibele laboratoriumstam H37Rv, een INH-sensibele en een INH-resistente sputumcultuur. Infectieduur in 3 perioden verdeeld.

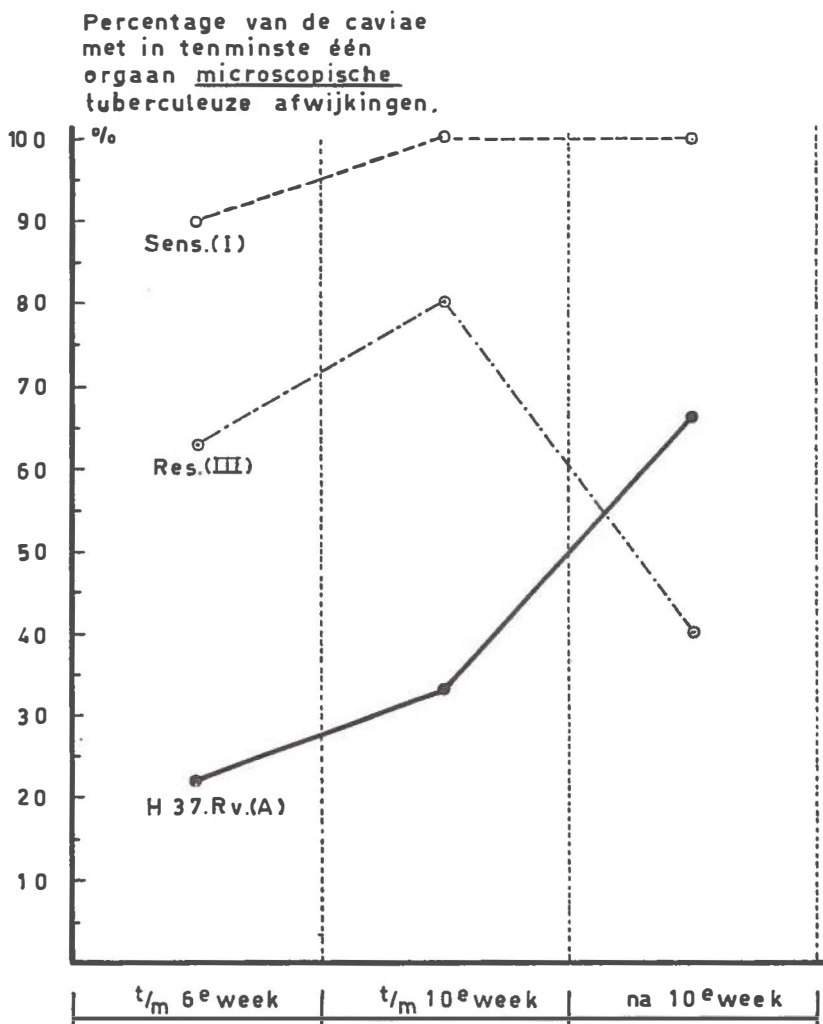


Fig. 2.

Verloop van de microscopische tuberculeuze afwijkingen bij caviae na infectie met een INH-sensibele laboratoriumstam H37Rv, een INH-sensibele en een INH-resistente sputumcultuur. Infectieduur in 3 perioden verdeeld.

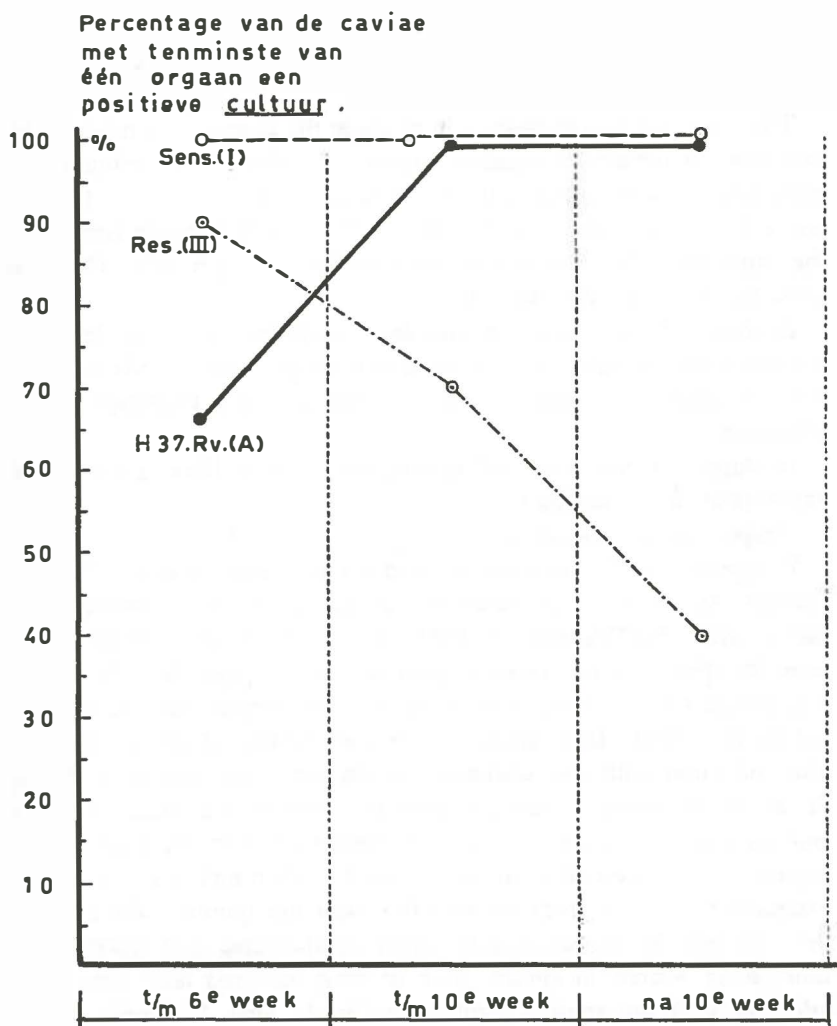


Fig. 3.

Verloop van de positieve orgaanculturen bij caviae na infectie met een INH-sensibele laboratoriumstam H37Rv, een INH-sensibele en een INH-resistente sputumcultuur. Infectieduur in 3 perioden verdeeld.

SUMMARY

The object of this research was to study the course of a tuberculous infection on tuberculin-negative guinea pigs when these animals had been infected with several cultures of tubercle bacilli. Special attention was paid to an infection with highly INH-resistant tubercle bacilli. At the same time the influence of isonicotinic acid hydrazide (INH) on these infections was investigated.

In chapter I the principal properties of INH-resistant tubercle bacilli are mentioned (sections 1-5). In section 6 the problem of INH-resistant tubercle bacilli in human beings is discussed with reference to the literature.

In chapter II the factors influencing the effect of INH in the animal experiments are mentioned.

Chapter III gives details about the present research.

It appeared from experiments A and I that there was a difference between the course of an infection caused by an INH-sensitive laboratory strain H37Rv and an INH-sensitive strain of tubercle bacilli from the sputum of an untreated patient (table 7, page 39). The guinea pigs infected by the laboratory strain survived longer than those infected by the culture from sputum. The body weight of the guinea pigs after infection with the laboratory strain increased gradually during 26 weeks' observation, whereas after infection by the strain from the sputum a loss of body weight was observed. Moreover, the macroscopic lesions in the spleen after infection with the laboratory strain were less extensive than those from the infection with the sputum culture. With the infection by the laboratory strain macroscopic and microscopic tuberculous lesions in spleen, liver or lung occurred later than after infection with the sputum population. In the first 10 weeks of the infection the percentage of guinea pigs with macroscopic and microscopic tuberculous lesions in spleen, liver or lung was significantly lower with the laboratory strain than with the sputum culture (figs. 1 and 2). In the first 6 weeks of the infection with the laboratory strain the percentage of positive cultures from these organs was lower than with the infection by the sputum strain (fig. 3).

Except for occasional exsudative-necrotic lesions in the spleen after infection with sputum culture, histological research carried out with hematoxylin and eosin, Azan and reticulum stain, showed that there

were no differences in the nature of histological tuberculous lesions in spleen, liver and lung occurring after infection with the two cultures.

CONCLUSION: The INH-sensitive laboratory strain H37Rv shows a lower virulence for guinea pigs than an INH-sensitive culture isolated from the sputum of an untreated patient. This attenuated virulence is evident in the first 10 weeks of the infection. The histological pictures of tuberculosis in spleen, liver or lung after infection with the laboratory strain and that of the sputum are identical.

From experiments B and II data were obtained concerning the therapeutic effect of INH with an infection by the INH-sensitive laboratory strain and the INH-sensitive sputum culture (tables 4 and 9, pages 36 and 42). Infection with the laboratory strain and treatment with INH did not show any macroscopic or histological tuberculous lesions in spleen, liver or lung throughout the observation period of 26 weeks, whereas in the case of infection with the sputum culture and treatment with INH, macroscopic and microscopic lesions were still found in the 10th week. The effect of INH was especially evident from the ability to culture tubercle bacilli from guinea pigs after the 10th week of the infection. After infection with the laboratory strain and application of INH it was no longer possible to culture tubercle bacilli from guinea pigs after the 10th week. With the infection by the sputum culture this was still possible with the majority of the guinea pigs. It proved, therefore, that INH was more effective with the infection by the least virulent strain, i.e. the laboratory strain.

Both with the infection by the laboratory strain and by the sputum culture, in some guinea pigs the Mantoux-reaction, which had become positive 6-7 weeks after infection, became negative again after treatment with INH. In a few animals tubercle bacilli from internal organs could be cultured, in spite of a negative tuberculin reaction.

CONCLUSION: The therapeutic effect of INH with experimental tuberculosis in guinea pigs is also determined by the virulence of the causative agent. The Mantoux-reaction which becomes positive with tuberculosis in guinea pigs, may become negative during the INH-treatment.

Experiments I, III, 1 and 2 compared an infection with INH-sensitive tubercle bacilli (exp. I and 1) with an infection caused by a tubercle bacilli culture, which was made homogeneously resistant to at least 30 mcg INH/ml (exp. III and 2).

After infection with resistant as well as with sensitive tubercle bacilli the Mantoux-reaction of the guinea pigs proved to be positive 6 weeks after infection. In this respect the infections were the same, but for the rest there were clear differences between the two infections. The guinea pigs infected with INH-resistant bacilli could be observed for 26 weeks, and those infected with sensitive bacilli for only 14 weeks. The latter died from tuberculous infection. In the guinea pigs infected with INH-resistant bacilli, the weight increased in the course of the infection; after infection with INH-sensitive bacilli the weight decreased. Macroscopic lesions in the spleen were, in the case of infection with the resistant bacilli, less extensive than after infection with sensitive tubercle bacilli. The number of guinea pigs with macroscopic tuberculous lesions in spleen, liver or lung after infection with resistant bacilli was lower than after infection with sensitive bacilli. The difference in macroscopic lesions is significant throughout the course of the infection as far as experiments I and III (table 12, page 47) are concerned, and with experiments 1 and 2 the macroscopic spleen lesions are significantly less frequent after infection with resistant bacilli, i.e. in the first 6 weeks and after the 10th week (table 20, page 60). The number of animals with histological lesions in the spleen after infection with resistant bacilli is significantly lower than after infection with sensitive bacilli; with experiments I and III (table 13, page 48) this difference is significant after the 6th week; with experiments 1 and 2 (table 23, page 64) there is a clear significance after the 10th week. Also, the number of positive organ cultures from guinea pigs infected with resistant bacilli are smaller than those from guinea pigs infected with INH-sensitive bacilli. The differences are significant for experiments I and III after the 6th week (table 14, page 48) and with experiments 1 and 2 the positive spleen cultures differ significantly in the period between the 7th and 11th weeks. After this the difference is nearly statistically significant (table 21, page 61).

Thus, an attenuated virulence of highly INH-resistant tubercle bacilli for guinea pigs was demonstrated from time of survival, course of weight, extent of macroscopic spleen lesions, number of animals with macroscopic and histological lesions, and the ability to culture tubercle

bacilli from the organs, compared with an INH-sensitive tubercle bacilli culture. This attenuated virulence was observed especially after the 10th week of infection.

The ability to culture sensitive tubercle bacilli from internal organs and the occurrence of histological tuberculous lesions in these organs during the first 2 weeks of the infection with INH-sensitive tubercle bacilli showed that the sensitive tubercle bacilli had spread from the site of injection within 2 weeks. The same was observed in the guinea pigs infected with INH-resistant bacilli. A „reduced invasive capacity”, attributed by MEISSNER (1959) to INH-resistant tubercle bacilli, could not be demonstrated by us.

During the course of the infection with resistant bacilli there proved to be a decrease in the number of animals with macroscopic and histological tuberculous lesions. At the same time the number of guinea pigs with positive organ cultures decreased. Thus, the tuberculous process with the resistant tubercle bacilli was regressive. The dying of the resistant tubercle bacilli is remarkable in this regressive process. In contrast with the infection by resistant bacilli an infection with sensitive bacilli showed that the number of guinea pigs with macroscopic or histological lesions and positive organ cultures increased from the time of infection. Thus, the tuberculous process with the sensitive bacteria was progressive.

If one infection proves to be regressive, and the other progressive, the difference between the two will be found after some time. In fact, our experiments showed that especially after the 10th week the percentages of the guinea pigs with macroscopic and histological lesions and those with positive organ cultures were clearly lower in the case of infection with resistant bacilli compared with infection with sensitive bacilli.

The regressive and progressive process of the infections with INH-resistant and INH-sensitive tubercle bacilli is shown in figs. 1, 2 and 3.

CONCLUSION: Compared with an INH-sensitive tubercle bacilli culture a highly INH-resistant tubercle bacilli culture is less virulent for guinea pigs. This attenuated virulence of INH-resistant tubercle bacilli is especially evident after the 10th week of the infection. The spreading of tubercle bacilli from the injection site to the organs occurs within 2 weeks, both with INH-sensitive and INH-resistant bacilli. The process of infection by INH-resistant

tubercle bacilli is regressive, whereas the process is progressive in the case of INH-sensitive bacilli.

On page 79 it was remarked that the INH-sensitive laboratory strain H37Rv demonstrated its attenuated virulence for guinea pigs in the first 10 weeks after infection, whereas the attenuated virulence of INH-resistant tubercle bacilli was evident after the 10th week. An infection with the laboratory strain H37Rv develops slowly at first, but gradually becomes progressive. On the other hand, an infection with INH-resistant tubercle bacilli shows an immediate development, but then becomes regressive. The process of the infections with the laboratory strain and of the INH-resistant culture is represented in figs. 1, 2 and 3.

CONCLUSION: Attenuated virulence for guinea pigs of tubercle bacilli is evident in various ways.

In experiments III and IV (table 19, page 53), 2 and 3 (tables 20, 21, 22, 23, pages 60, 61, 63 and 64) the influence was studied of INH-treatment in the case of an infection with highly INH-resistant tubercle bacilli. INH-therapy with this infection had no significant influence on the macroscopic or microscopic organ lesions or on the ability to culture the tubercle bacilli from guinea pigs. An unfavourable influence of INH in the case of an infection with highly INH-resistant tubercle bacilli, as described in the literature (page 30) was not evident from our experiments.

CONCLUSION: INH in our experiments has no influence in the case of an infection of guinea pigs with highly INH-resistant tubercle bacilli.

With the aid of hematoxylin and eosin, Azan and reticulum stain a histological research on liver, spleen and lung was carried out. It proved that only with the infection by INH-sensitive tubercle bacilli were exsudative-necrotic lesions sometimes seen in the spleen, but for the rest there appeared to be no difference in the nature of the histological tuberculous lesions due to an infection by INH-sensitive or INH-resistant bacilli. The tubercle bacilli recultured from the organs had retained their original rates of resistance, so that it may be assumed that the lesions were really the result of INH-sensitive or INH-resistant bacilli.

The „Retothelknötchen” described by KRACHT and PLIQUETT (1960), which were believed to occur in the liver after infection with INH-resistant bacilli, were not observed in our material. In our experiments there was no evidence of fibrosis of the tubercles after infection with INH-resistant bacilli, as mentioned by VINK et al. (1956). The absence of „Retothelknötchen” and fibrosis of the tubercles might be connected with the difference in dose of infection and the extent of resistance of the tubercle bacilli used.

CONCLUSION: Except for occasional exsudative-necrotic lesions in the spleen after infection with INH-sensitive bacilli, there is no difference in the nature of the histological tuberculous lesions in spleen, liver or lung of guinea pigs after infection with INH-sensitive or highly INH-resistant tubercle bacilli.

Histological research on the organs of guinea pigs showed a discrepancy in some cases between the histological findings and the evidence of tubercle bacilli in the organ, whether the Ziehl-Neelsen stain of the section or the organ culture was employed (tables 24 and 25, page 66).

The frequent occurrence of evident tuberculous lesion in spleen, liver or lung of guinea pigs with a negative Ziehl-Neelsen stain of the section, might prove that the presence of tubercle bacilli in the tissues is difficult to demonstrate with this stain. Sometimes the histological picture was positive for tuberculosis, whereas the culture from the same organ was negative. The reverse, a negative histology with positive organ culture also occurred. This discrepancy was observed with infections by sensitive as well as by resistant tubercle bacilli.

The discrepancy which sometimes exists between histological research and organ culture may be of practical importance, i.e. when material (sputum, urine, pleural exsudate, menstrual blood or punctates) is tested for the presence of tubercle bacilli by infecting guinea pigs. Not only the culture method should be applied, but also histological research should be carried out, especially on the spleen, because in this way the most frequent positive results are obtained.

CONCLUSION: Histological research of spleen, liver or lung of guinea pigs after infection with INH-sensitive or INH-resistant tubercle bacilli is sometimes in disagreement with the evidence of tubercle bacilli in the organ, whether the Ziehl-Neelsen stain

or the organ culture is applied. The histological picture may be positive for tuberculosis, whereas the organ culture is negative. It is also possible that the histological research is negative, and the culture positive. When infection of guinea pigs is applied as a diagnostic method to demonstrate the presence of tubercle bacilli in a certain material, it is recommended, therefore, not to restrict the research to the Mantoux-reaction, the injection site, or the lymphnode, but also to apply the organ culture and histological research of the spleen.

LITERATUURLIJST

- AMER. TRUDEAU SOCIETY: (1953) Amer. Rev. Tuberc. 68, 951 — Laboratory Subcommittee on Medical Research.
- BALDAMUS, U. en PONICK, U.: (1956) Beitr. Klin. Tuberk. 115, 425 — Klinische Beobachtung über den Tuberkuloseablauf bei INH-resistenten Patienten.
- BALDAMUS, U. en PONICK, U.: (1956) Beitr. Klin. Tuberk. 116, 203 — INH-Resistenz und Klinik.
- BARNETT, M.; BUSHBY, S. R. M. en MITCHISON, D. A.: (1953) Lancet 314 — Isoniazid-resistant strains of tubercle bacilli: Their development and stability.
- BARNETT, M.; BUSHBY, S. R. M. en MITCHISON, D. A.: (1953) Brit. J. Exp. Path. 34, 568 — Tubercle bacilli resistant to isoniazid: virulence and response to treatment with isoniazid in guinea pigs and mice.
- BARRY, V. C.; CONALTY, M. L. en GAFFNEY, E.: (1953) Lancet 1, 978 — Isoniazid-resistant strains of mycobacterium tuberculosis.
- BARTMANN, K.: (1960) Advances Tuberc. Res. 10, 127 — Die experimentellen Grundlagen der Chemoprophylaxe der Tuberkulose mit Isonicotinäurehydrazid (INH).
- BARTMANN, K.: (1963) Isoniazid. Möglichkeiten und Grenzen seiner Wirkung. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- BARTMANN, K.; VILLNOW, J. en SCHWARZ, CH.: (1955) Beitr. Klin. Tuberk. 115, 79 — Tierexperimentelle Untersuchungen zu einer intermittierenden Chemotherapie und -prophylaxe der Tuberkulose.
- I. Mitteilung. Der Erfolg intermittierenden Gaben von 10 mgr INH je Kilogramm Körpergewicht im Simultanversuch an Meerschweinchen.
- BARTMANN, K.; VILLNOW, J. en SCHWARZ, CH.: (1956) Beitr. Klin. Tuberk. 115, 269 — Tierexperimentelle Untersuchungen zu einer intermittierenden Chemotherapie und -prophylaxe der Tuberkulose.
- II. Mitteilung. Der Erfolg zweimal wöchentlich verabfolgter Gaben von INH in verschiedener Dosierung beim Simultanversuch an Meerschweinchen.
- BARTMANN, K.; VILLNOW, J. en SCHWARZ, CH.: (1957) Beitr. Klin. Tuberk. 116, 471 — Tierexperimentelle Untersuchungen zu einer intermittierenden Chemotherapie und -prophylaxe der Tuberkulose.
- III. Mitteilung. Prophylaktische Versuche mit INH an massiv infizierte Meerschweinchen.
- BARTMANN, K.; VILLNOW, J. en SCHWARZ, CH.: (1957) Beitr. Klin. Tuberk. 116, 687 — Tierexperimentelle Untersuchungen zu einer intermittierenden Chemotherapie und -prophylaxe der Tuberkulose.
- IV. Mitteilung. Versuche an Meerschweinchen zur Prophylaxe einer Minimalinfektion mit intermittierenden INH Gaben.
- BARTMANN, K.; VILLNOW, J. en SCHWARZ, CH.: (1957) Beitr. Klin. Tuberk. 117, 344 — Tierexperimentelle Untersuchungen zu einer intermittierenden Chemotherapie und -prophylaxe der Tuberkulose.
- V. Mitteilung. Virulenz- und Resistenzprüfungen von Kulturen aus Gewebe INH behandelter Meerschweinchen.

- BARTMANN, K.; VILLNOW, J. en SCHWARZ, CH.: (1959) Beitr. Klin. Tuberk. 121, 460 — Tierexperimentelle Untersuchungen zu einer intermittierenden Chemotherapie und -prophylaxe der Tuberkulose.
- IX. Mitteilung. Versuche an Meerschweinchen zur Prophylaxe einer Minimalinfektion mit kontinuierlichen und intermittierenden INH-Gaben.
- BEEUWKES, H.: (1950) Ned. Tijdschr. v. Geneesk. 94, 3347 — Voorlopige mededeling over het bepalen van de gevoeligheid van tuberkelbacteriën tegen streptomycine.
- BERNARD, E.; KREIS, B. en LE JOUBIOUX, E.: (1955) Rev. de la Tub. 19, 1113 — Sur les bacilles tuberculeux de faible virulence isolés après traitement par l'isoniazide.
- BERNARD, E.; KREIS, B. en LE JOUBIOUX, E.: (1957) Rev. de la Tub. 21, 429 — Evolution clinique de 31 cas de tuberculose cavitaire avec bacilles isoniazide-résistants de faible virulence expérimentelle.
- BLOCH, H.; WIDELOCK, D. en PEIZER, L. R.: (1953) Amer. Rev. Tuberc. 68, 734 — Susceptibility to isoniazid and pathogenicity of tubercle bacilli.
- BOJALIL, L. F.; RUY PEREZ-TAMAYO en BASTARRACHEA, F.: (1958) Amer. Rev. Tuberc. 77, 473 — Persistence of tubercle bacilli in the organs of guinea pigs under chemotherapy.
- BÖNICKE, R.: (1956) Ztschr. f. Hyg. und Infektionskrankh. 142, 347 — Untersuchungen über die antikatalatische Wirkung des Isoniazids bei Mycobakterien.
- BÖNICKE, R.: (1957) Beitr. Klin. Tuberk. 117, 171 — Katalaseaktivität, Virulenz und Isoniazidempfindlichkeit der Tuberkulosebakterien.
- CANETTI, G.: (1954) Bull. Un. Int. Tuberc. 24, 148 — Les modifications anatomiques et bactériologiques au niveau des lésions tuberculeuses sous l'influence des antibiotiques et de la chimiothérapie.
- CANETTI, G.; GRUMBACH, F. en GROSSET, J.: (1960) Amer. Rev. Resp. Dis. 82, 295 — Studies of bacillary populations in experimental tuberculosis of mice treated by isoniazid.
- CANETTI, G.; RIST, N. en GROSSET, J.: (1964) Amer. Rev. Resp. Dis. 90, 792 — Primary drug resistance in tuberculosis.
- CHAVES, A. D.; ROBINS, A. B.; ABELES, H.; PEIZER, L. R.; DANGLER, G. en WIDELOCK, D.: (1955) Amer. Rev. Tuberc. 72, 143 — The prevalence of streptomycin- and isoniazid resistant strains of mycobacterium tuberculosis in patients with newly discovered and untreated active pulmonary tuberculosis.
- CHAVES, A. D.; ROBINS, A. B.; ABELES, H.; PEIZER, L. R.; DANGLER, G. en WIDELOCK, D.: (1956) Amer. Rev. Tuberc. 74, 293 — Further observations on the prevalence of streptomycin- and isoniazid resistant strains of mycobacterium tuberculosis in patients with newly discovered and untreated active pulmonary tuberculosis.
- COATES, E. O.; MEADE, G. M.; STEENKEN, W.; WOLINSKY, E. en BRINKMANN, G. L.: (1953) The New England J. of Med. 248, 1081 — The clinical significance of the emergence of drug resistant organisms during the therapy of chronic pulmonary tuberculosis with hydrazides of isonicotinic acid.

- COHEN, A. C. en GLINSKY, G. C.: (1955) *Amer. J. Med. Sc.* 230, 70 — Virulence of isoniazid-resistant tubercle bacilli in man.
- COHN, M. L.; ODA, U.; KOVITZ, C. en MIDDLEBROOK, G.: (1954) *Amer. Rev. Tuberc.* 70, 465 — Studies on isoniazid and tubercle bacilli. I. The isolation of isoniazid-resistant mutants in vitro.
- COHN, M. L.; KOVITZ, C.; ODA, U. en MIDDLEBROOK, G.: (1954) *Amer. Rev. Tuberc.* 70, 641 — Studies on isoniazid and tubercle bacilli. II. The growth requirements, catalase activities and pathogenic properties of isoniazid-resistant mutants.
- CONALTY, M. L.: (1953) *Irish J. Med. Science* 6, 267 — The in vitro and in vivo activity of isoniazid on m. tuberculosis.
- CONALTY, M. L. en GAFFNEY, E. E.: (1955) *Amer. Rev. Tuberc.* 71, 799 — Studies on isoniazid-resistant strains of mycobacterium tuberculosis. II. Virulence for mice and guinea pigs and the growth pattern (Cording) in vitro of strains resistant to 100 micrograms of isoniazid per milliliter.
- DAVID, H. en de ALEMQUER, M.: (1960) *Acta Tuberc. Scandinavica* 39, 172 en 185 — Etudes sur les bacilles de la tuberculose résistants à l'isoniazide. I. Introduction et comportement in vitro. II. Pouvoir pathogénique pour le cobaye.
- VAN DIJK, B.: (1957) *Proc. Tuberc. Res. Counc.* 44, 43 — Resistance, catalase-activity and virulence of tubercle bacilli in the laboratory.
- FEREBEE, S. H. en PALMER, C. A.: (1956) *Amer. Rev. Tuberc. and Pulm. Dis.* 73, 1 — Prevention of experimental tuberculosis with isoniazid.
- DE FIGUEIREDO, F. P. en DE PAOLA, D.: (1957) *Amer. Rev. Tuberc. and Pulm. Dis.* 76, 871 — Atypical histologic aspects of pulmonary tuberculosis as related to attenuations or loss of pathogenicity of isoniazid-resistant strains of M. tuberculosis.
- DE FIGUEIREDO, F. P.; DE PAOLA, D. en DIAS, L. B.: (1960) *Amer. Rev. Resp. Dis.* 81, 358 — The finding of giant cells in the sputum of tuberculous patients.
- FISHER, M. W.: (1952) *Amer. Rev. Tuberc.* 66, 626 — Growth characteristics of isoniazid resistant tubercle bacilli.
- FISHER, M. W.: (1954) *Amer. Rev. Tuberc.* 69, 797 — Hemin as a growth factor for certain isoniazid-resistant strains of mycobacterium tuberculosis.
- FOX, W.: (1962) *Lancet* II 413, 473 — The chemotherapy and epidemiology of tuberculosis.
- FOX, W. en SUTHERLAND, I.: (1955) *Thorax* 10, 85 — The clinical significance of positive cultures and of isoniazid-resistant tubercle bacilli during the treatment of pulmonary tuberculosis.
- FOX, W.; WIENER, A.; MITCHISON, D. A.; SELKON, J. B. en SUTHERLAND, I.: (1957) *Tubercle* 38, 71 — The prevalence of drug-resistant tubercle bacilli in untreated patients with pulmonary tuberculosis.
- FREERKSEN, E.: (1957) *Bull. Un. Int. Tuberc.* 27, 222 — The clinical significance of bacterial resistance tests.
- FUST, B. en STUDER, A.: (1952) *Helv. paediat. Acta* 7, 558 — Isoniazid (Rimifon) bei experimenteller Meningitis tuberculosa.

- GENTRY, W.: (1958) *Amer. Rev. Tuberc.* 77, 940 — The effects of chemotherapy upon the tuberculin skin reaction in guinea pigs infected with the H37Rv strain of tubercle bacilli.
- GERBEAUX, J.; NOUFFLARD, H.; GUY-LOE; ROUCHON, M. en LE LIRSIN, M.: (1962) *Rev. de Tub. et de Pneum.* 26, 434 — Primo-infection tuberculeuse de l'enfant à bacilles résistants au cours des années 1957-1960.
- GERNEZ-RIEUX, CH.; BEERENS, H.; DU BOIS, R.; FABRE, M. en FOURNIER, P.: (1953) *Rev. de la Tub.* 17, 48 — Etude expérimentale et résultats des observations cliniques concernant l'action tuberculostatique de l'INH.
- GERNEZ-RIEUX, CH.; TACQUET, A.; VOISIN, C. en FABRE, M.: (1955) *Rev. de la Tub.* 19, 1 — Virulence pour le cobaye, la souris et le hamster des bacilles résistants à l'isoniazide.
- GIERHAKKE, F. W.: (1955) *Beitr. Klin. Tuberk.* 113, 415 — Dauerheilung der experimentelle Meerschweinchtuberkulose durch Isonicotinsäurehydrazid.
- GOULDING, R.: (1955) *The British J. of Exp. Path.* 36, 628 — *Mycobacterium tuberculosis*: A study of the virulence of an isoniazid resistant strain.
- DE GRAAFF, J. L.: (1965) Een onderzoek naar de klinische betekenis van de serumconcentraties van isonicotinezuurhydrazide en streptomycine. Diss. Groningen.
- HIRSCH, J.: (1952) *Die Naturwissenschaften* 39, 525 — Zur experimentellen Chemotherapie der Isonicotinsäurehydrazid (INH)-resistenten Tuberkulose.
- HIRSCH, J.: (1956) *Beitr. Klin. Tuberk.* 116, 268 — Theorien und therapeutischer Wert der kombinierten Anwendung von Tuberculostatika.
- HOBBY, G. L.; JOHNSON, P. M.; LENERT, T. F. e.a.: (1964) *Amer. Rev. Resp. Dis.* 89, 337 — A continuing study of primary drug resistance in tuberculosis in a veteran population within the United States.
- HUMBERT, R.: (1954) *Ztschr. f. gesamte exp. Med.* 124, 355 — Biologische Heilung experimenteller Tuberkulose durch Isoniazid?
- JENSEN, K. A.: (1955) *Bull. Un. Int. Tuberc.* 25, 89 — Report of the sub-committee of laboratory methods of the international Union against Tuberculosis.
- KARLSON, A. G.: (1954) *Amer. Rev. Tuberc.* 70, 531 — Regression of tuberculous lesions in guinea pigs infected with isoniazid-resistant tubercle bacilli.
- KARLSON, A. G. en IKEMI, Y.: (1952) *Proc. Staff Meet. Mayo Clinic* 27, 373 — Effect of isonicotinic acid hydrazide (Isoniazid) on survival time of mice infected with tubercle bacilli resistant to the drug in vitro.
- KARLSON, A. G. en IKEMI, Y.: (1954) *Proc. Staff Meet. Mayo Clinic* 29, 119 — Comparison of the virulence for mice and guinea pigs of an isoniazid-sensitive tubercle bacillus and its isoniazid-resistant variant.
- KNOX, R.; MEADOW, P. M. en WORSSAM, A. R. H.: (1956) *Amer. Rev. Tuberc.* 73, 726 — The relationship between the catalase activity, hydrogen peroxide sensitivity, and isoniazid resistance of mycobacteria.
- KOCH, M. L. en COTE, R. A.: (1965) *Amer. Rev. Resp. Dis.* 91, 283 — Comparison of fluorescence microscopy with Ziehl-Neelsen stain for demonstration of acid-fast bacilli in smear preparations and tissue sections.

- KRACHT, J.: (1957) Kongressbericht der V ten wissenschaftlichen Tagung der Norddeutschen Tuberkulose-Gesellschaft 62 — Vergleichende anatomische und bakteriologische Untersuchungen an Lungenresektionspräparaten.
- KRACHT, J. en MEISSNER, G.: (1956) Frankfurter Zeitschr. Path. 67, 391 — Wachstumshormon und Cortison bei experimenteller Tuberkulose mit unterschiedlicher Keimvirulenz.
- KRACHT, J. en MEISSNER, G.: (1957) Therapeutische Berichte, 29, 86 — Zur pathologischen Leistung Isoniazid-resistenter Mycobakterien.
- KRACHT, J. en MEISSNER, G.: (1958) Beitr. Klin. Tuberk. 118, 379 — Untersuchungen an Lungenresektionspräparaten: II Mitteilung. Beziehungen zwischen INH-Behandlung-Erregerbiologie und Herdstruktur.
- KRACHT, J. en PLIQUETT, R.: (1960) Beitr. Klin. Tuberk. 122, 282 — Histopathologie der regressiven Tuberkulose des Meerschweinchens nach Infektion mit Isoniazid-resistenten Mycobakterien.
- KREBS, A.: (1956) Beitr. Klin. Tuberk. 115, 460 — Beitrag zur Frage der Virulenz chemoresistenter Tuberkelbakterien.
- KREBS, A. en KÄPPLER, W.: (1956) Klin. W'schrift 31/32, 873 — Intoleranz INH-resistenter T.B.B. Stämme gegenüber glycerin.
- MACKANESS, G. B. en SMITH, N.: (1953) Amer. Rev. Tuberc. 67, 322 — The bactericidal action of isoniazid, streptomycin and terramycin in extracellular and intracellular tubercle bacilli.
- MEISSNER, G.: (1954) Beitr. Klin. Tuberk. 110, 538 — Zur Frage der Virulenz chemoresistenter Tuberkelbakterien: II Mitteilung. In vivo INH-resistent gewordene Tuberkelbakterien.
- MEISSNER, G.: (1954) Dis. Chest 26, 15 — The virulence of isoniazid resistant tubercle bacilli recovered from patients during treatment.
- MEISSNER, G.: (1955) Beitr. Klin. Tuberk. 113, 62 — Zur Frage der Virulenz chemoresistenter Tuberkelbakterien. III Mitteilung. Mischungen von sensibelen und INH-resistenten Einzelkolonie Kulturen.
- MEISSNER, G.: (1955) Beitr. Klin. Tuberk. 113, 280 — Zur Frage der Virulenz chemoresistenter Tuberkelbakterien. IV Mitteilung. Die Virulenz-schädigung von Sputumstämmen in Abhängigkeit von ihrer Sensibilitätsminderung gegenüber INH.
- MEISSNER, G.: (1956) Beitr. Klin. Tuberk. 116, 125 — Zur Frage der epidemiologischen Bedeutung INH-resistenter, virulenz geschädigter Tuberkelbakterien.
- MEISSNER, G.: (1956) Fortschritte der Tuberkuloseforschung VII, 52 — Isoniazid-resistente Tuberkelbakterien.
- MEISSNER, G.: (1957) Beitr. Klin. Tuberk. 117, 186 — Die Virulenz-abschwächung der Tuberkelbakterie unter INH Behandlung und die Bedeutung solcher Stämme für die Tuberkulose des Menschen.
- MEISSNER, G.: (1957) Kongressbericht der V ten wissenschaftlichen Tagung der Norddeutschen Tuberkulose-Gesellschaft 54 — Bakteriologische Untersuchungen an Lungenresektionspräparaten.
- MEISSNER, G.: (1959) Acta Tuberc. Scandinavica Vol. XXXVII, 1-2 — Der Einfluss des Bazillus auf den Ablauf der Tuberkulose.

- MEISSNER, G. en BÖNICKE, R.: (1957) Beitr. Klin. Tuberk. 116, 501 — Die Beziehungen zwischen Katalase-Inaktivierung, Sensibilitätsminderung für Isoniazid und Virulenzschädigung für das Meerschweinchen.
- MEISSNER, G. en KRACHT, J.: (1956) Beitr. Klin. Tuberk. 116, 144 — Untersuchungen an Lungenresektionspräparaten. I Mitteilung. Die Wirkung der INH-Behandlung auf INH-resistenz und Virulenzschädigung der Tuberkelbakterien. (Bakteriologische Untersuchungen).
- MIDDLEBROOK, G.: (1954) Amer. Rev. Tuberc. 69, 471 — Isoniazid-resistance and catalase activity of tubercle bacilli.
- MIDDLEBROOK, G. en COHN, M. L.: (1953) Science 118, 297 — Some observations on the pathogenicity of isoniazid-resistant variants of tubercle bacilli.
- MIDDLEBROOK, G.; COHN, M. L. en SCHAEFER, W. B.: (1954) Amer. Rev. Tuberc. 70, 852 — Studies on isoniazid and tubercle bacilli. III The isolation, drug-susceptibility and catalase-testing of tubercle bacilli from isoniazid-treated patients.
- MITCHISON, D. A.: (1954) Amer. Rev. Tuberc. 69, 640 — Virulence of isoniazid-resistant tubercle bacilli.
- MITCHISON, D. A.: (1954) Brit. Med. Journal I, 128 — Tubercle bacilli resistant to isoniazid. Virulence and response to treatment with isoniazid in guinea pigs.
- MORSE, W. C.; WEISER, O. L.; KUHS, D. M.; FUSILLO, M.; DAIL, M. C. en EVANS, J. R.: (1954) Amer. Rev. Tuberc. 69, 464 — Study of the virulence of isoniazid-resistant tubercle bacilli in guinea pigs and mice.
- MULDER, R. J.: (1957) Proc. Tuberc. Res. Counc. 44, 51 — The clinical significance of the loss of virulence of isoniazid-resistant tubercle bacilli.
- MULDER, R. J.: (1960) Resultaten van de chemotherapie bij longtuberculose. Diss. Groningen.
- MULDER, R. J.: (1962) Bijscholingscursus voor CB-artsen 5 — Bacteriologische vraagstukken en tuberculostatica.
- MULDER—DE JONG, M. T.: (1960) Over de tuberkelbacteriën in gereseceerde longdelen. Diss. Groningen.
- NIGOGHOSSIAN, G. A.: (1953) Schweiz. Med. W'schrift 83, 432 — Résultats du traitement par l'hydrazide de l'acide isonicotinique (INH) de cobayes inoculés avec des B.K. (H37Rv) résistants à celui-ci.
- NOUFFLARD, H.: (1955) Ann. Inst. Past. 88, 325 — Etudes sur la virulence des bacilles tuberculeux résistants à l'isoniazide.
- OESTREICHER, R.; DRESSLER, S. H.; RUSSELL, W. F.; GROW, J. B. en MIDDLEBROOK, G.: (1955) Amer. Rev. Tuberc. 71, 390 — Observations on the pathogenicity of isoniazid-resistant mutants of tubercle bacilli for tuberculous patients.
- PALMER, C. E.; FEREBEE, S. H. en HOPWOOD, L.: (1956) Amer. Rev. Tuberc. 74, 917 — Studies on prevention of experimental tuberculosis with isoniazid. Effects of different dosage regimens.
- PEIZER, L. R.; CHAVES, A. D. en WIDELock, D.: (1957) Amer. Rev. Tuberc. 76, 732 — The effects of early isoniazid treatment in experimental guinea pig tuberculosis.

- PEIZER, L.; MINKIN, A. en WIDELOCK, D.: (1954) *Amer. Rev. Tuberc.* 70, 728 — A further study of virulence in guinea pigs of isoniazid-resistant tubercle bacilli isolated from clinical material.
- PEIZER, L. R. en WIDELOCK, D.: (1955) *Amer. Rev. Tuberc.* 72, 246 — The correlation of rate of catalase activity, guinea pig virulence, and isoniazid resistance of tubercle bacilli from specimens of patients under isoniazid therapy.
- PEIZER, L. R.; WIDELOCK, D. en KLEIN, S.: (1953) *Amer. Rev. Tuberc.* 68, 290 — Virulence in guinea pigs of isoniazid-resistant cultures isolated from clinical specimens.
- PEIZER, L. R.; WIDELOCK, D. en KLEIN, S.: (1956) *Amer. Rev. Tuberc.* 74, 428 — Certain in vivo and in vitro observations on m.tuberculosis.
- PETIT, A.: (1953) *Schweiz. Med. W'schrift* 83, 754 — Note relative à la diminution de la résistance à l'isonicotinic-acid-hydrazide (INH), après la cessation du traitement.
- PONGOR, F. en BERENCSI, G.: (1963) *Acta Tuberc. et Pneum. Scandinavica* Vol. XLIII, 99 — Catalase activity of mycobacterium tuberculosis and pulmonary tuberculosis.
- REISS, J. en TOWNSEND, S. M.: (1957) *Dis. Chest* 32, 274 — The rising incidence of isoniazid resistance: Its clinical significance.
- RIST, N.; GRUMBACH, M. F. en LIBERMANN, C.: (1954) *Gaz. Med. de France* 61, 191 — Les bacilles résistants à l'isoniazide sont-ils avirulents?
- RIST, N.; LIBERMANN, C.; GRUMBACH, F. en LEVADITI, J. C.: (1955) *Rev. de la Tub.* 19, 659 — Sur le pouvoir pathogène des bacilles tuberculeux isoniazido-résistants.
- SCHAEFER, W. B.: (1954) *Amer. Rev. Tuberc.* 69, 125 — The effect of isoniazid on growing and resting tubercle bacilli.
- SCHMIDT, L. H.: (1956) *Amer. Rev. Tuberc.* 74, 980 — Some observations on the utility of simian pulmonary tuberculosis in defining the therapeutic potentialities of isoniazid.
- SEELEMAN, M. en BUSCHKI, H.: (1957) *Zentralblatt für Veterinärmedizin* 4, 101 — Chemoprophylaktische Versuche bei Rindertuberkulose.
- SEELEMAN, M. en BUSCHKI, H.: (1958) *Zentralblatt für Veterinärmedizin* 5, 609 — Chemoprophylaktische Versuche bei Rindertuberkulose.
- SEELEMAN, M.; BUSCHKI, H. en RACKOW, H. G.: (1957) *Zentralblatt für Veterinärmedizin* 4, 80 — Chemoprophylaktische Versuche bei Rindertuberkulose.
- SHER, B. C.; CZAJA, Z. G.; TAKIMURA, Y. en POPPER, H.: (1957) *Amer. Rev. Tuberc.* 75, 295 — The course of experimental tuberculosis inhibited by isoniazid.
- SINGH, B.: (1964) *Amer. Rev. Resp. Dis.* 89, 1 — The guinea pig virulence of Indian tubercle bacilli.
- STEENKEN, W. en WOLINSKY, E.: (1953) *Amer. Rev. Tuberc.* 68, 548 — Virulence of tubercle bacilli recovered from patients treated with isoniazid.
- STEENKEN, W. en WOLINSKY, E.: (1954) *Amer. Rev. Tuberc.* 70, 375 — Virulence of isoniazid-resistant tubercle bacilli.

- STEWART, S. M.: (1954) *Amer. Rev. Tuberc.* 69, 641 — Virulence of tubercle bacilli recovered from patients treated with isoniazid.
- STONEBRINK, B.: (1958) *Acta Tuberc. Scandinavica* 35, 67 — The use of a pyruvate containing egg medium in the culture of isoniazid-resistant strains of mycobacterium tuberculosis var. hominis.
- TACQUET, A.; GERNEZ-RIEUX, CH. en GAUDIER, B.: (1954) *Ann. Inst. Past.* 87, 335 — l'Hydrolyse de l'urée par les mycobactéries.
- TIRUNARAYANAN, M. O. en VISCHER, W. A.: (1957) *Amer. Rev. Tuberc.* 75, 62 — Relationship of isoniazid to the metabolism of mycobacteria. Catalase, peroxidase and isoniazid relation in mycobacteria.
- TUCZEK, H. en SAUPE, M.: (1952) *Münch. Med. W'schrift* 94, 1307 — Erfahrungen mit dem Isonikotylhydrazid „Rimifon“ bei Tuberkulose.
- U.S. PUBLIC HEALTH SERVICE: (1964) *Amer. Rev. Resp. Dis.* 89, 327 — Prevalence of drug resistance in previously untreated patients.
- VELTMAN, G.: (1955) *Ztrbl. für Bakt., Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene* 163 — Beitrag zur Frage einer Virulenzänderung der Tuberkelbakterien nach langdauernder Chemotherapeutische Behandlung.
- VINK, H. H.; MANTEN, A. en BEKKER, J. H.: (1956) *Amer. Rev. Tuberc.* 74, 633 — Some observations on the pathology of the lesions caused by isoniazid-resistant tubercle bacilli in the guinea pig.
- VINK, H. H.; MANTEN, A. en BEKKER, J. H.: (1956) *Ned. T. Geneesk.* 16, 1149 — Afwijkende weefselreacties als symptoom van de verminderde virulentie van tuberkelbacteriën die resistent tegen INH zijn.
- VISCHER, W. A.: (1956) *Schweiz. Z. Path. Bakt.* 19, 710 — Über die Virulenz von Isonicotinesäurehydrazid-resistenten Tuberkelbakterien beim Meerschweinchen.
- WOLINSKY, E.; SMITH, M. M. en STEENKEN, W.: (1956) *Amer. Rev. Tuberc.* 73, 768 — Isoniazid susceptibility, catalase activity and guinea pig virulence of recently isolated cultures of tubercle bacilli.
- ZAIDI, S. H.; HARRISON, C. V.; KING, E. J. en MITCHISON, D. A.: (1955) *The British J. of Exp. Path.* 36, 545 — Experimental infective pneumoconiosis. Coalmine dust and INH resistant tubercle bacilli of moderate virulence.
- ZAIDI, S. H.; HARRISON, C. V.; KING, E. J. en MITCHISON, D. A.: (1955) *The British J. of Exp. Path.* 36, 553 — Massive pulmonary fibrosis produced by coalmine dust and INH resistant tubercle bacilli of low virulence.